OMMONWEALTH INST.
ECHNOLOGY LIBRARY
22 FEB 1961
Eu 86
IAL
EPARATE

TIJDSCHRIFT OVER PLANTEZIEKTEN

JAARGANG 66 - 1960

5e AFLEVERING

Uitgave van de

NEDERLANDSE PLANTEZIEKTENKUNDIGE VERENIGING

Onder redactie van

Dr. J. A. VON ARX, Mej. H. L. G. DE BRUYN,
Dr. J. A. A. M. H. GOOSSENS, Prof. Dr. A. J. P. OORT, Mevr. Ir. M. POST-BAKKER
Prof. Dr. J. P. H. VAN DER WANT en Dr. H. H. EVENHUIS (Secretaris)

Redactie-adres: Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek,
Binnenhaven 4*a*, Wageningen

BESTUUR

VAN DE NEDERLANDSE PLANTEZIEKTENKUNDIGE VERENIGING

Dr. P. M. L. Tammes, Wageningen, *Voorzitter*
Ir. J. A. J. Veenenbos, Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen, *Secretaris*
Dr. A. P. Kole, Lab. v. Fytopathologie, Binnenhaven 4, Wageningen, *1e Penningmeester*
Postrekening no. 92 31 65 ten name van Penningmeester van de Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging te Wageningen
Mevr. Ir. M. Post-Bakker, Lawickse Allee 80, Wageningen, *2e Penningmeesteresse*
Ir. H. J. de Bruin, Wageningen
H. P. Dijksterhuis, Garrelsweer
Dr. J. C. s' Jacob, Wageningen
Ir. J. Walravé, Wageningen
Prof. Dr. J. P. H. van der Want, Lisse

Lidmaatschap Ned. Planteziektenkundige Vereniging

Nederland, Suriname en de Nederlandse Antillen f 7,50, België f 7,50, Buitenland f 8,50. Leden ontvangen het tijdschrift gratis.

Opzegging van het lidmaatschap moet vóór 1 december van het lopende jaar geschieden, anders is de contributie voor het volgende jaar verschuldigd.

Abonnement Tijdschrift

Nederland, Suriname en de Nederlandse Antillen f 10,—, België f 10,—, Buitenland f 13,50. Betaling op postrekening no. 92 31 65 t.n.v. Penningmeester Ned. Planteziektenkundige Vereniging te Wageningen.

Advertentiën

Prijzen per plaatsing: ⅛ pag. f 12,50; ¼ pag. f 20,—; ½ pag. f 30,—; 1 pag. f 55,—.
Bij 3 maal plaatsen van dezelfde advertentie 10 procent korting.
Bij 6 maal plaatsen van dezelfde advertentie 20 procent korting.

Voor plaatsing wende men zich tot de secretaris der Redactie-Commissie, p.a. Binnenhaven 4*a*, Wageningen, tel. 2151, of tot H. Veenman & Zonen N.V., Wageningen, tel. 2242.

INHOUD

HOOFDARTIKELEN

G. VAN DEN ENDE – Morfologie en parasitair karakter van *Septotinia podophyllina. With a summary: Morphology and parasitism of* Septotinia podophyllina 269

S. H. JUSTESSEN and P. M. L. TAMMES – Studies of yield losses I. The self-limiting effect of injurious or competitive organisms on crop-yield. *Met een samenvatting: Studiën over oogstverlies I. Het effect van concurrentie tussen schadelijke organismen bij toenemend aantal* 281

L. C. P. KERLING en D. H. BRANTS – Een virus in *Atropa belladonna. With a summary: A virus in* Atropa belladonna 288

J. DIJKSTRA and P. GRANCINI – Serological and electron microscopical investigations of the relationship between the *Sorghum* red stripe virus and sugar cane mosaic virus. *Met een samenvatting: Serologisch en elektronenmicroscopisch onderzoek naar de verwantschap tussen het* „Sorghum *red stripe*" *virus en het suikerrietmozaïekvirus* . . . 295

KORTE MEDEDELING

J. DIJKSTRA and P. GRANCINI – Electron microscopical investigations of mosaic diseased wheat plants found in Italy. *Met een samenvatting: Elektronenmicroscopisch onderzoek van in Italië gevonden mozaïekzieke tarweplanten* 301

T. Pl.ziekten 66 (1960): 269–280

MORFOLOGIE EN PARASITAIR KARAKTER VAN *SEPTOTINIA PODOPHYLLINA*[1]

With a summary: Morphology and parasitism of Septotinia podophyllina

DOOR

G. VAN DEN ENDE

Phytopathologisch Laboratorium „Willie Commelin Scholten", Baarn[2]

INLEIDING

Van het geslacht *Septotinia* WHETZEL, behorend tot de *Sclerotiniaceae (Discomycetes)*, zijn tot op heden twee soorten beschreven, namelijk *Septotinia podophyllina* WHETZEL en *Septotinia populiperda* WATERMAN & CASH. Beide veroorzaken bladvlekken, respectievelijk op de Noordamerikaanse *Podophyllum peltatum* L., behorend tot de familie der *Berberidaceae* en op soorten en cultivars van het geslacht *Populus*.

Eind september 1956 werd in een griendcultuur te Opijnen in de Betuwe een aantasting gevonden van jonge toppen van *Salix fragilis* L. cv. Belgisch rood; bovendien kwamen er op de bladeren van deze cultivar bladvlekken voor, die veel overeenkomst vertoonden met die op populierebladeren, veroorzaakt door *Septotinia populiperda* (fig. 1A en 1B). Bij microscopisch onderzoek bleek, dat zich zowel op de bladeren als op de aangetaste stengeldelen van *Salix fragilis* sporodochiën bevonden met conidiën, die naar vorm en grootte overeen kwamen met die van *Septotinia populiperda*. Dat deze schimmel tot het geslacht *Septotinia* behoorde was wel zeker, maar het was de vraag of men hier met één van de reeds bekende of met een nieuwe soort te doen had.

VAN DEN ENDE (1952) kon geen morfologisch verschil tussen de perfecte stadia van de beide bovengenoemde soorten aantonen. Op grond van de daardoor gerezen twijfel aangaande het bestaan van twee verschillende soorten, werden nu opnieuw *Septotinia*-isolaties bestudeerd, ditmaal stammen afkomstig van *Podophyllum*, populier en *Salix fragilis*. Zij werden in morfologisch opzicht vergeleken en ook werd hun gedrag ten opzichte van deze waardplanten nagegaan.

MATERIAAL EN METHODE

De in tabel 1 genoemde isolaties werden tijdens het onderzoek afwisselend gekweekt op kers- en aardappelagar. De inoculaties geschiedden door middel van stukjes agar met mycelium, geponst uit petrischalen waarin de schimmel gedurende vier tot zeven dagen bij 23 °C gegroeid had.

Als toetsplanten stonden ter beschikking: *Salix fragilis* cv. Belgisch rood en Frans geel, *Populus candicans*, *Populus canadensis* cv. brabantica en cv. gelrica en planten van *Podophyllum peltatum*.

[1] Aangenomen voor publikatie 14 mei 1960.

[2] Tegenwoordig adres: Botanisch Laboratorium, R.K. Universiteit, Nijmegen.

Bij takinoculaties werden sneden in de schors tot op het hout gemaakt. In zo'n snede werd een ponsstukje mycelium aangebracht; daarna werden vochtige watten op de wond gelegd, die met elastoplast werden omwikkeld.

TABEL 1. *Septotinia*-isolaties, voor het onderzoek gebruikt.
Septotinia *isolates, used for this study.*

Naam *Name*	Auteur *Author*	Geïsoleerd door *Isolated by*	Herkomst *Origin*	Datum van isolatie *Date of isolation*
1. *Septotinia podophyllina*	WHETZEL	DRAYTON	*Podophyllum peltatum*	mei 1936 *May*
2. ,,	,,	WHETZEL	,,	mei 1936 *May*
3. *S. populiperda*	WATERMAN & CASH	V. D. ENDE	*Populus canadensis* cv. deltoides	juli 1957 *July*
4. ,,	,,	,,	*Populus* sp.	juni 1951 *June*
5. ,,	,,	SCHMIDLE	,,	mei 1953 *May*
6. *S.* sp., nieuwe stam *new strain*	–	V. D. ENDE	*Salix fragilis* cv. Belgisch rood	okt. 1956 *Oct.*
7. ,,	–	,,	,,	okt. 1957 *Oct.*
8. ,,	–	,,	,,	okt. 1957 *Oct.*

3. uit/*from* Keppel 6. uit/*from* Opijnen 7. uit/*from* Langbroek
8. uit/*from* Vorchten

GROEI EN HABITUS VAN DE SCHIMMEL IN REINCULTUUR

Om de groei en de habitus van de verschillende herkomsten van de schimmel in vitro na te gaan, werden de acht schimmelstammen op kers- en aardappelagar geënt en in een stoof bij 23 °C geplaatst. De habitus van het mycelium varieerde van rijkelijk hyalien luchtmycelium tot vlak, dicht over de agar groeiend geelbruin mycelium. De jongste isolaties vertoonden de weelderigste groei. Dergelijke variaties werden reeds eerder gevonden en wel bij éénsporecultures, verkregen uit ascosporen afkomstig van een populier. Van de op 16 april 1959 geënte stammen vormden de nummers 1, 3 en 8 (tabel 1) sclerotiën van verschillende vorm. De isolatie afkomstig van *Podophyllum peltatum* vormde in het algemeen slechts kleine sclerotiën, de stam van populier meest grotere. Dergelijke variaties zijn reeds door WHETZEL (1937) beschreven bij isolaties van *Septotinia* afkomstig van *Podophyllum peltatum*. Ook hij vond grote verschillen tussen éénsporecultures, zowel in habitus als in groei van het mycelium.

Om de groeisnelheid van het mycelium van de acht stammen te vergelijken, werden van elk der stammen stukjes uitgeponst en geënt op petrischalen, waarin 20 ml kersagar gegoten was. De schimmels kregen eerst gedurende 24 uren bij 20 °C de gelegenheid „aan te slaan". Op de schalen werd daarna aangegeven

tot hoever de kolonies zich reeds uitgebreid hadden, waarna de schalen weer bij 20 °C geplaatst werden, bij welke temperatuur zij gedurende twee dagen verbleven. Deze temperatuur werd gekozen, omdat bij 20 °C de groei van het mycelium ongeveer optimaal is en ook omdat volgens SCHWENKE (1959) bij een temperatuur van 19° à 20°C de virulentie beter behouden bleef dan bij andere temperaturen. De groeisnelheid van de schimmelstammen varieerde sterk en kon niet gecorreleerd worden met hun herkomst (tabel 2).

TABEL 2. Groei van het mycelium in mm gedurende 48 uur bij 20°C van acht verschillende *Septotinia*-isolaties.
Mycelial growth in mm during 48 *hours at 20°C of eight different* Septotinia *isolates.*

Nummer *Septotinia*-stam *Number of* Septotinia *strain*	Geïsoleerd *Isolated*		Myceliumgroei in mm *Growth rate of mycelium in mm*				
	Herkomst *Origin*	Datum *Date*	I		II		Gem. *Average*
1	*Podophyllum*	mei 1936	19,5	16,4	18,5	19,1	18,4
2	,,	mei 1936	10,1	10,2	10,0	10,0	10,1
3	*Populus*	juli 1957	15,7	19,2	19,4	18,9	18,3
4	,,	juni 1951	19,5	17,7	21,1	21,7	20,0
5	,,	mei 1953	15,1	14,7	16,5	16,7	15,7
6	*Salix*	okt. 1956	15,1	14,5	19,1	15,1	15,9
7	,,	okt. 1957	12,0	11,1	12,6	11,7	11,8
8	,,	okt. 1957	21,7	20,9	24,1	24,2	22,7

I en II: twee proeven, elk in duplo na elkaar verricht.
I and II: Experiment replicated twice.
Gem.: gemiddelde van vier metingen.
Average: average of four measurements.

Op grond van de habitus van het mycelium, de sclerotiënvorming en de groeisnelheid van het mycelium konden de isolaties afkomstig van de drie waardplanten dus niet onderscheiden worden.

AFMETINGEN DER CONIDIËN

Het was wenselijk ook de afmetingen der conidiën van de drie herkomsten met elkaar te vergelijken. Daar de schimmelstammen in vitro geen conidiën vormen, moest worden overgegaan tot het vergelijken van in vivo op de waardplanten gevormde sporen. Daartoe werden de stammen 1, 3 en 6 uitgekozen, waarmee bladeren van tweejarige populieren en wilgen in de tuin van het laboratorium werden geïnoculeerd. Een groot aantal bladeren werd aangeprikt en vervolgens besproeid met een in een mixer fijn verdeelde mycelium-suspensie van elk der drie stammen. De planten werden voor een deel vochtig gehouden in bakken met glazen wanden en voor een deel gehuld in plastic zakken. Alle drie stammen veroorzaakten bladvlekken met sporodochiën. Op de populieren vormden alle stammen overvloediger conidiën dan op de wilgen.

Van iedere stam en waardplant werden voor zover mogelijk 80 conidiën gemeten en wel van één-, twee-, drie- en viercellige sporen elk 20 (tabel 3). De verkregen uitkomsten werden vervolgens aan een nadere analyse onderworpen

met behulp van de zogenaamde t-toets van „Student". Bij beschouwing van de breedte van de conidiën traden duidelijke significante verschillen op en wel waren zonder uitzondering de sporen van de stam afkomstig van wilg significant

TABEL 3. De gemiddelde maten van conidiën, afkomstig van bladvlekken op bladeren van *Populus canadensis* en *Salix fragilis*, veroorzaakt door *Septotinia*-stammen van populier, wilg en *Podophyllum*.

Average size of conidia from leaf blotches on leaves of Populus canadensis *and* Salix fragilis, *caused by* Septotinia *strains, isolated from poplar, willow and* Podophyllum

Septotinia herkomst Septotinia *origin*	Conidiën, afkomstig van bladvlekken van: *Conidia from leaf blotches of:*	Lengte × breedte van de conidiën: *Length × width of the conidia:*			
		1-cellig *1-celled*	2-cellig *2-celled*	3-cellig *3-celled*	4-cellig *4-celled*
Podophyllum	*Populus canadensis*	15,6 × 7,0μ	22,2 × 7,8μ	29,6 × 7,8μ	33,2 × 7,8μ
Populus	„ „	16,8 × 7,0	25,3 × 7,4	30,0 × 7,4	35,1 × 7,8
Salix	„ „	16,8 × 8,6	23,0 × 9,4	30,4 × 10,2	33,9 × 9,8
Podophyllum	*Salix fragilis*	(12,1 × 5,5)	(20,7 × 5,6)	(33,5 × 7,0)	– –
Populus	„ „	19,1 × 6,0	26,5 × 7,0	32,0 × 6,4	36,7 × 7,4
Salix	„ „	22,2 × 7,4	23,4 × 8,2	31,6 × 9,0	40,9 × 8,4

Het aantal metingen per object bedroeg 20; de getallen tussen haakjes zijn gemiddelden van een kleiner aantal metingen.

Each size average was based on 20 measurements; the numbers between brackets are averages of a smaller number of measurements.

breder dan de sporen van de stam afkomstig van populier en dan de sporen afkomstig van *Podophyllum*. Aan dit significante verschil in breedte kan echter weinig waarde gehecht worden, daar het verschil in breedte tussen de conidiën van stam 3, opnieuw geïsoleerd van populier en van dezelfde stam 3, maar nu van wilg teruggeïsoleerd, ook significant is. De aard van deze waardplanten beïnvloedt blijkbaar de breedte van de sporen, zoals ook bij de andere isolaties werd waargenomen. Het is dus niet gerechtvaardigd aan deze verschillen waarden toe te kennen, waarop een soortsverschil gebaseerd zou kunnen worden.

Reeds eerder (VAN DEN ENDE, 1952) werd de morfologie van het perfecte stadium besproken, op grond waarvan er geen voldoende grond aanwezig werd geacht om *Septotinia podophyllina* WHETZEL en *Septotinia populiperda* WATERMAN & CASH als twee soorten te handhaven. Een vergelijking van het perfecte stadium van de schimmel afkomstig van wilg met de beide andere was niet mogelijk, daar er zich geen apotheciën in reincultuur ontwikkelden en deze ook buiten niet werden gevonden.

INOCULATIE-PROEVEN

Om eventuele pathogeniteitsverschillen tussen de schimmelstammen te kunnen vaststellen, werden op 27 maart 1957 inoculaties verricht met de stammen 1, 4 en 6, respectievelijk afkomstig van *Podophyllum peltatum*, populier en wilg, op bladeren van *Populus candicans* en *Populus canadensis* cv. gelrica. Op 17 april 1957 werden bladeren van *Salix fragilis* cv. Belgisch rood en cv. Frans geel op overeenkomstige wijze behandeld. De bladeren werden aan de plant geïn-

oculeerd; vlak voor de inoculatie werd de helft van de te behandelen bladeren verwond met een prepareernaald. De inoculaties werden verricht in een kas, waarin de planten eind januari geplaatst waren. Het bleek dat de drie stammen alleen pathogeen waren voor populier en wilg, maar dat er verschillen in virulentie vielen waar te nemen. De stam afkomstig van populier en de stam afkomstig van *Podophyllum* bleken zowel op populier als op wilg aanvankelijk een langzamere uitbreiding te hebben dan de stam afkomstig van wilg. Deze stam was de jongste isolatie. Zonder beschadiging trad geen aantasting op.

Op 16 augustus 1957 werden gezonde bladeren van *Populus canadensis* cv. brabantica en *Salix fragilis* cv. Belgisch rood met water schoon gespoeld en op vochtig filtreerpapier in petrischalen gelegd. Per stam werden drie bladeren gebruikt, waarvan er twee werden aangeprikt met een prepareernaald. Hierop werden uitgeponste stukjes mycelium gelegd van de schimmelstammen 1, 3 en 6. Na drie dagen werden de stukjes verwijderd. Ook hier bleek dat geen van de drie stammen het onbeschadigde blad aantastte en dat de schimmelstam afkomstig van populier, een verse isolatie van 13 juli 1957, nu virulenter was dan de beide andere stammen. Dat deze stam virulenter was, kan verklaard worden uit het feit, dat deze gedurende kortere tijd in reincultuur was geweest dan de beide andere stammen. Deze ondervinding deden ook SCHMIDLE (1955) en SCHWENKE (1957) bij hun inoculatieproeven op. Daarom werden de schimmelstammen afkomstig van wilg en *Podophyllum* uit de verkregen bladvlekken opnieuw geïsoleerd. De volgende inoculaties werden nu uitgevoerd met deze herisolaties en de bovengenoemde jonge isolatie van populier. Alle drie stammen bleken nu op wilg en populier flinke bladvlekken te veroorzaken. Een herhaling van deze proef leidde tot eenzelfde resultaat. Het virulenter worden na een passage door de waardplant en het feit, dat de schimmel op de gebruikte voedingsbodems in vitro geen conidiën vormt, duidt op een sterke gebondenheid aan de parasitaire levenswijze.

Van de Hortus Botanicus van de Gemeente-Universiteit van Amsterdam werden wortelstokken van *Podophyllum peltatum* ontvangen en hieruit werden enige planten gekweekt. Op deze planten werden inoculatieproeven uitgevoerd met de stammen 1, 2, 3, 6 en 8 tussen 24 juli en 12 oktober 1959. De bladeren werden aangeprikt en op de gaatjes werden stukjes mycelium van vier dagen oude cultures gelegd. De planten werden in kastjes drie dagen vochtig gehouden en daarna werd het stukje verwijderd.

De stammen 1, 3, 6 en 8 veroorzaakten bladvlekken op *Podophyllum peltatum*, die overeenkwamen met die beschreven door WHETZEL (1937). Na uitbreiding vertoonden de vlekken een lichtbruin centrum, omgeven door een zone met concentrische ringen, waaromheen paarsbruin verkleurd bladweefsel. De schimmel kon uit de vlekken opnieuw geïsoleerd worden (tabel 4, fig. 2A). De uitbreiding langs de nerven van de eerste orde gaat meestal sneller dan in andere richtingen. Wanneer het mycelium de bladsteel bereikt, dringt het daarin binnen, waardoor het weefsel afsterft en de bladschijf omknikt (fig. 2B). Zowel stammen afkomstig van *Podophyllum* als van wilg en populier waren in staat de bladsteel te bereiken en deze tot afsterven te brengen. Bij uitleggen van de bladsteel op kersagar bleek de schimmel hierin over een lengte van 3,5 cm te zijn doorgedrongen. Alleen stam 2, een isolatie van *Podophyllum peltatum* zelf, bleek zijn pathogeniteit te hebben verloren.

Uit deze proeven blijkt dus, dat er geen verschil in parasitair karakter tussen

TABEL 4. Aantal geslaagde inoculaties met *Septotinia* van verschillende herkomst op bladeren van *Podophyllum peltatum*.
Number of succesful inoculations with Septotinia *strains of different origin on* Podophyllum peltatum.

Septotinia herkomst Septotinia *origin*	Datum van inoculatie *Date of inoculation*				
	24–7–'59	6–8–'59	13–8–'59	25–9–'59	12–10–'59
Phodophyllum st. Drayton	2/2[1]	–	–	5/5	3/3
st. Whetzel	0/2	0/2	0/2	–	–
Populus sp. st. Keppel	–	0/2	2/2	5/5	–
Salix sp. st. Vorchten	–	2/2	2/2	2/5	–
st. Opijnen	–	–	–	–	3/3
Controle	0/2	–	0/2	0/5	–

st. stam *strain*
– niet geïnoculeerd *not inoculated*

[1] teller: aantal geslaagde inoculaties
numerator: number of succesful inoculations
noemer: aantal verrichte inoculaties
denominator: number of inoculations performed

de verschillende herkomsten van de schimmel viel waar te nemen. Daar er zowel bij *Salix* als bij *Populus* spp. een taksterven kan voorkomen, veroorzaakt door *Septotinia* (SCHWENKE, 1957, 1959) werd nagegaan of de isolaties zich in dit opzicht mogelijk verschillend zouden gedragen.

TAKINOCULATIES

Op 25 april 1957 werden in de kas inoculaties verricht op de toppen van takken van *Salix fragilis* cv. Belgisch rood. Voor deze proef werden de schimmelstammen no. 1, 4 en 6 gebruikt. Met elke stam werden twee planten geïnoculeerd en wel twee twijgen per plant. De dikte van de twijgen varieerde tussen 1,5 en 5 mm. Met de drie herkomsten werden dezelfde resultaten bereikt: na 10 dagen waren duidelijk symptomen zichtbaar bij de dunne twijgen, de bladeren verwelkten en de takjes verschrompelden. Bij dikkere takken had een sterke uitbreiding van de schimmel in de lengterichting van de tak plaats. Het aangetaste weefsel werd donkerbruin en zonk enigszins in. Uiteindelijk werd de tak omgord, de aangetaste plek werd intussen lichter van kleur en er werden sporodochiën gevormd. Soms ontstond wondcallus boven de afsnoering. Van de schors bleven alleen de hardere weefsels als vezels zichtbaar. De tak knikte meestal op de wonde om en het er boven gelegen gedeelte stierf af. Alleen de dikste twijgen vertoonden een behoorlijke wondreactie en herstelden.

De proef werd in augustus 1957 in de kas herhaald met vier planten per object. Dunne twijgen van 1,5–3 mm dikte werden geïnoculeerd met de stammen

1 en 4, respectievelijk afkomstig van *Podophyllum* en van populier. Hetzelfde resultaat werd verkregen en de schimmel kon uit de aangetaste delen weer geïsoleerd worden.

Inoculaties werden zowel in het voorjaar als in de zomer in de kas verricht bij bebladerde takken van *Populus candicans* en *Populus canadensis* cv. brabantica met de stammen 1, 2, 3, 6 en 8. Er ontstonden wel aantastingen, maar de wonde werd vrij snel overgroeid. Op 17 april 1959 werden dezelfde inoculaties nog eens uitgevoerd in de tuin van het laboratorium op tweejarige, 8 tot 12 mm dikke takken van *Populus candicans* op het tijdstip, waarop de knoppen juist

TABEL 5. Uitbreiding in mm van de aangetaste plekken van telkens 10 takken van *Populus candicans* na inoculatie met *Septotinia* van verschillende herkomst.
Increase in lesion size, in mm, on each of 10 branches of Populus candicans *after inoculation with* Septotinia *strains of different origin.*

Septotinia herkomst Septotinia *origin*	Uitbreiding na (dagen) *Increase after (days)*	Nummer van de takken *Number of branches*										Gem. *Average*
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Podophyllum												
st. Drayton	18	40	8	8	23	13	17	18	11	13	28	17,9
	98	41	10	omg.	25	15	17	18	13	13	32	21,3
st. Whetzel	18	13	10	10	11	11	12	14	10	–	–	11,4
	98	18	17	13	12	16	12	16	13	–	–	14,6
Populus sp.												
st. Keppel	18	44	43	51	50	58	48	47	52	57	omg.	50,0
	98	omg.	omg.	omg.	omg.	omg.	omg.	omg.	omg.	omg.	omg.	–
st. Keppel	18	52	72	55	60	58	59	60	62	48	59	58,5
	98	omg.	omg.	69	omg.	omg.	omg.	70	74	omg.	omg.	71,0
Salix sp.												
st. Opijnen	18	30	30	25	25	30	25	29	35	22	24	27,5
	98	omg.	omg.	28	24	25	18	30	42	22	30	27,4
st. Vorchten	18	23	32	25	33	32	48	30	42	30	31	32,7
	98	34	35	39	omg.	47	omg.	37	omg.	34	omg.	37,7
alleen verwonding	18	10	9	10	10	12	11	11	11	10	12	10,6[1]
wounding only	98	10	8	10	10	10	9	10	8	9	9	9,3[2]

Gem.: gemiddelde lengte van de aangetaste plek
Average: average length of the lesions
omg.: omgord
girdled
st.: stam
strain

[1] in tegenstelling tot de aantasting door *Septotinia* trad bij verwonding nooit necrose op
in contrast to the lesions caused by Septotinia, *wounding alone never gave rise to necrosis*

[2] alle wonden geheel of bijna geheel gesloten
all wounds closed or nearly so

enige werking vertoonden. Later bleek, dat vijf van de zes stammen in staat waren een gedeeltelijke of gehele omgording van de tak te veroorzaken (tabel 5, fig. 3A en 3B). De virulentie van de verschillende stammen wisselde echter sterk. De beste resultaten werden ook hier verkregen met de jongste isolaties. De stammen 1 en 2, die het langst in reincultuur waren, gaven de minst goede resultaten, hetgeen zich uitte zowel in het aantal takken dat omgord werd als in de grootte van de ontstane wonde. Het ziektebeeld kwam overeen met dat bij *Salix* beschreven. Uit de aangetaste delen kon de schimmel op 28 juli 1959 nog weer geïsoleerd worden.

Uit de boven beschreven resultaten blijkt dat de *Septotinia*-stammen, onverschillig hun herkomst, in staat zijn zowel takken van wilg als van populier te omgorden en tot afsterven te brengen. Wel kon bij de takinoculaties op populier die buiten verricht werden, tussen de verschillende schimmelstammen een verschil in virulentie worden waargenomen, dat toegeschreven moet worden aan een lang verblijf van de schimmel in vitro. Ook SCHWENKE (1957) vermeldt dat hij voor het verkrijgen van taksterven bij populier moest uitgaan van verse isolaties. Aanvankelijk verrichtte hij inoculaties met een stam, die hij van SCHMIDLE ontvangen had, doch deze bleek niet meer in staat te zijn de takken in ernstige mate aan te tasten. Herisolaties van deze stam bleken echter weer sterk virulent te zijn.

BESPREKING VAN DE RESULTATEN

In 1952 konden door VAN DEN ENDE geen morfologische verschillen worden gevonden tussen het perfecte stadium van *Septotinia podophyllina* WHETZEL en *Septotinia populiperda* WATERMAN & CASH. In latere jaren werden vorm en afmetingen van de conidiën van beide schimmels nagegaan, waarbij tevens vergelijkingen werden getroffen met die van een nieuwe isolatie van een *Septotinia* sp., afkomstig van aangetaste bladeren van *Salix fragilis*. Uit dit onderzoek is gebleken, dat er tussen de conidiënvormen en afmetingen van deze verschillende herkomsten geen zodanige verschillen te vinden zijn, dat er soortsverschillen op kunnen worden gebaseerd. Bij wiskundige verwerking van de sporemetingen, werden bij de lengtemetingen van de conidiën, onverschillig hun herkomst, geen significante verschillen gevonden. Wel traden significante verschillen op tussen de breedten van de conidiën gevormd op populierebladeren, respectievelijk door de stam afkomstig van wilg en door stammen afkomstig van de beide andere waardplanten. Een *Septotinia*-stam afkomstig van populier leverde echter ook significante verschillen op tussen de breedten van conidiën gevormd op een populiereblad en die gevormd op een wilgeblad. Op dit laatste was de breedte geringer, hetgeen ook het geval was bij sporen, oorspronkelijk van wilg geïsoleerd. Tussen de breedten van de conidiën van de stam afkomstig van populier en die van de stam afkomstig van *Podophyllum* werden geen significante verschillen gevonden. De breedte van de conidiën schijnt een variabele eigenschap te zijn, waarop de waardplant van invloed is. Dat de één- en tweecellige conidiën van *Septotinia populiperda* korter zouden zijn dan die van *Septotinia podophyllina* zoals WATERMAN & CASH (1950) aangeven, kon niet bevestigd worden (tabel 4).

Bij de inoculatieproeven op bladeren van *Salix fragilis*, *Populus* spp. en *Podophyllum peltatum* werden duidelijke bladvlekken verkregen met alle *Septotinia-*

herkomsten. De virulentie van de verschillende stammen nam af naar mate zij langer in cultuur waren gehouden, doch na een passage door de waardplant werden zij weer virulenter. Hetzelfde vermelden SCHWENKE (1957) en SCHMIDLE (1955), die werkten met *Septotinia*-stammen geïsoleerd van populier.

De takinoculaties van *Salix fragilis* en *Populus candicans* wezen uit, dat de verschillende herkomsten van de schimmel ook een afsterven van jonge toppen en een omgorden van takken konden veroorzaken. Bij de inoculaties op de populieretakken kwam het verschil in virulentie, veroorzaakt door de ouderdom van de cultures der verschillende schimmelstammen, duidelijk naar voren.

Daar er door ons morfologische verschillen noch verschillen in parasitair karakter gevonden werden tussen de schimmelstammen geïsoleerd uit *Podophyllum peltatum*, *Populus* spp. en *Salix fragilis*, moeten deze alle tot dezelfde soort gerekend worden en wel tot:

Septotinia podophyllina WHETZEL – Mycologia 29, 135 (1937),
syn.: *Septotinia populiperda* WATERMAN & CASH – Mycologia 42: 374 (1950),
conidiënvorm: **Septotis podophyllinum** (ELLIS & EV.) v. ARX, Verh. Kon. Ned. Akad. Wetensch., Afd. Natuurk. 2e reeks, 51 (3): 1–153 (1957),
syn.: *Gloeosporium podophyllinum* (ELLIS & EV.) – J. Mycol. 4: 103 (1888),
Septogloeum podophyllinum (ELLIS & EV.) SACC. – Syll. Fung. 10: 497 (1892),
Septogloeum populiperdum MOESZ & SMARODS – Magyar Bot. Lapok 31: 39 (1932),
Septoriopsis podophyllina (ELLIS & EV.) WHETZEL – Mycologia 29: 133 (1937),
Septotis populiperda (MOESZ & SMARODS) WATERMAN & CASH – Mycologia 42: 377 (1950),
Septogloeum populiperdum JOHANNES – Phytopath. Z. 17: 406 (1950).

WHETZEL (1937) toonde aan dat het conidiën-stadium van de schimmel niet overeenkwam met de beschrijving van een toen bekend geslacht. Hij achtte het echter niet noodzakelijk om een nieuwe naam aan de conidiën-vorm te geven, daar het perfecte stadium bekend was. BUCHWALD (1949) stelde de naam *Septotis* voor als naam voor het conidiën-stadium van *Septotinia*. Daar meestal slechts dit stadium wordt aangetroffen en het perfecte stadium in verschillende landen nooit gevonden is en daar ook VON ARX (1957) de naam *Septotis* reeds gebruikt voor het conidiën-stadium van de schimmel door WHETZEL beschreven, heb ik in deze BUCHWALD (1949) en VON ARX (1957) gevolgd. Het conidiënstadium moet dus de naam *Septotis podophyllinum* (ELLIS & EV.) v. ARX dragen.

De door JOHANNES (1950 en 1951) beschreven schimmel moet als identiek beschouwd worden met de hier onderzochte schimmel. Hij beschrijft niet de typische bladvlekken, die door WATERMAN & CASH (1950), VAN DEN ENDE (1952), SCHMIDLE (1953) en anderen beschreven worden, maar volgens een mondelinge mededeling van SCHMIDLE waren deze wel op de door JOHANNES gevonden bladeren aanwezig. De bladsymptomen die JOHANNES beschrijft, werden ook door ons waargenomen op bladeren van *Populus candicans* zonder de typische bladvlekken van *Septotis*. Bij uitleggen van deze bootvormig opgekrulde bladeren kon *Septotinia* noch een andere parasiet geïsoleerd worden. Zij moeten mijns inziens aan een fysiogene oorzaak worden toegeschreven (zie ook SCHMIDLE 1953, 1955 en BUTIN, 1957).

Door het aantasten van populieren kreeg *Septotinia podophyllina* economische betekenis. Men vroeg zich af hoe deze populiereparasiet in Amerika was gekomen. GRAVATT (1952) meende, dat de schimmel via stekmateriaal uit Europa

was ingevoerd, maar reeds in 1888 beschreven ELLIS en EVERHART in Amerika dezelfde schimmel onder de naam *Gloeosporium podophyllinum* op *Podophyllum peltatum*. Daar nu bewezen is, dat de schimmel van deze plant op populier kan overgaan, is het niet uitgesloten dat de schimmel op deze wijze in Amerika op populieresoorten terecht is gekomen. Op deze mogelijkheid wees ook MARQUIS (1955). Beide schimmelaantastingen worden namelijk in het oosten van de Verenigde Staten aangetroffen. Bovendien werd de schimmel pas vele jaren later in Europa beschreven door MOESZ (1932) en SMARODS (1932).

De topsterfte, veroorzaakt door *Septotis* bij wilgen, is door het vezelige voorkomen en het omknikken van de dode toppen duidelijk te onderscheiden van de aantasting van *Salix americana* door *Pollaccia saliciperda* (ALL. & TUB.) VON ARX, syn.: *Fusicladium saliciperdum* (ALL. & TUB.) LIND. waarbij de jonge toppen omkrullen en afsterven. Aantastingen van wilgen werden in ons land gevonden in grienden te Opijnen (Betuwe), te Langbroek (Utrecht) en te Vorchten (Overijsel). Van een aanmerkelijke schade kon echter niet worden gesproken.

SUMMARY

Two species have been described in the literature in the genus *Septotinia*. They are *Septotinia podophyllina* WHETZEL and *Septotinia populiperda* WATERMAN & CASH, with *Podophyllum peltatum* and poplar species and hybrids as host plants respectively. A dieback of the twigs of *Salix fragilis* cv. „Belgisch rood" was observed in the Netherlands at three places in September 1956 and 1957. From the damaged cortex at some distance from the tip of the branches only fibres were left and at that site the dead tip turned upside down. This disease symptom was decidedly different from that caused by *Pollaccia saliciperda* (ALL. & TUB.) VON ARX, syn.: *Fusicladium saliciperdum* (ALL. & TUB.) LIND. On the leaves of this cultivar leaf blotches were present with sporodochia (Fig. 1A en B). Both symptoms were caused by a *Septotinia*-species. To determine the identity of this fungus its character had to be compared with the *Septotinia* spp. already described. Moreover, the possibility that *Septotinia populiperda* WATERMAN & CASH was synonymous with *Septotinia podophyllina* WHETZEL, as presumed by VAN DEN ENDE (1952), needed further verification. In order to study their morphology eight isolates of *Septotinia* from different host plants were cultivated in pure culture on cherry and potato dextrose agar (Table 1). The growth habit and the growth rate of the mycelia were compared. None of the characters appeared to be typical for either of the strains (Table 2). The variations found here agree with the differences between different mono-ascospore cultures from one *Septotinia* strain isolated from poplar during earlier investigations. WHETZEL (1937) found the same variability, when culturing eight isolates obtained from eight ascospores out of one ascus. Also the sizes of the conidia of three strains, originating from *Populus canadensis*, *Salix fragilis* and *Podophyllum peltatum* were compared. In a few cases the differences in conidial size of two strains seemed to be significant. Therefore spores were also measured from three strains originating from *Populus canadensis*, *Salix fragilis* and *Podophyllum peltatum*, inoculated on leaves of *Populus canadensis* and *Salix fragilis* (Table 3). Differences in length of the conidia were not significant; however, differences in width sometimes were. Width differences were found not only between

Fig. 1A

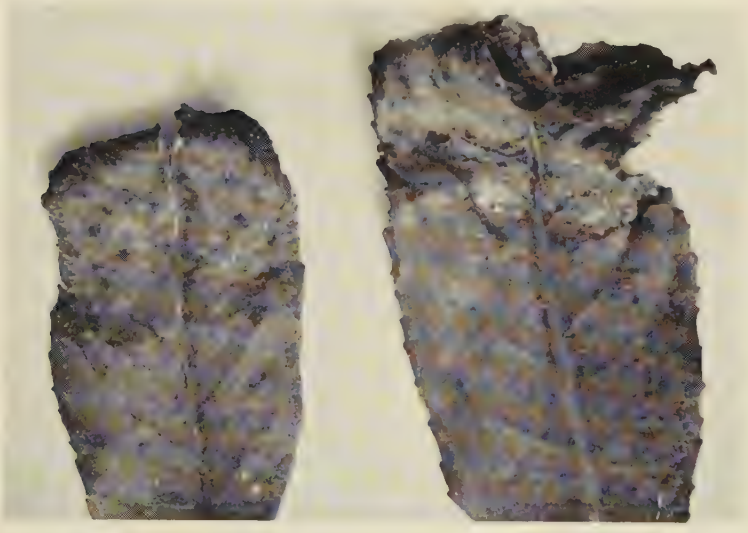

Fig. 1B

FIG. 1. Natuurlijke aantasting van *Salix fragilis* cv. Belgisch rood door *Septotinia* sp.;
A. topsterfte,
B. bladaantasting; de sporodochiën zijn zichtbaar als witte puntjes.
Natural infection caused by Septotinia *sp. on* Salix fragilis *cv. "Belgisch rood";*
A. *dieback,*
B. *leaf blotch; the sporodochia are visible as white points.*

Fig. 2A

Fig. 2B

FIG. 2. *Podophyllum peltatum*, aangetast door *Septotinia* sp.;
A. bladvlekken veroorzaakt door een *Septotinia*-stam van *Podophyllum peltatum* (onder) en door een *Septotinia*-stam afkomstig van *Salix fragilis* (boven),
B. aantasting van de bladsteel.
Podophyllum peltatum *inoculated by* Septotinia *sp.;*
A. *leaf spots caused by a* Septotinia *strain, originating from* Podophyllum peltatum *(lower) and by a* Septotinia *strain originating from* Salix fragilis *(upper)*,
B. *necrosis of the petiole.*

Fig. 3A

Fig. 3B

FIG. 3. Takken van *Populus candicans*, geïnoculeerd met *Septotinia* sp., stam 3;
A. tak gedeeltelijk omgord; B. tak geheel omgord.
Branches of Populus candicans, *inoculated with the* Septotinia *strain* 3, *originating from poplar;*
A. *branch partly girdled*; B. *branch entirely girdled.*

conidia of two strains but also between the conidia of one strain inoculated on leaves of *Populus canadensis* and on leaves of *Salix fragilis*. The host plant seemed to be of influence on the width of the conidia. Moreover, there was a great variability in size of the conidia of all strains. The measurements did not indicate that the strains should belong to different species. Neither did the strains originating from the three host plants differ in their parasitic behaviour. All strains tested caused leaf blotches on slightly wounded leaves of *Salix fragilis* cv. „Belgisch rood" and cv. „Frans geel", on *Populus candicans*, *Populus canadensis* cv. „gelrica" and on *Podophyllum peltatum* (Table 4). The leaves of the latter could be killed by all strains after the mycelium had penetrated from the leaf blade into the petioles (Fig. 2A and 2B). When introduced into wounded stems of *Populus candicans* and *Salix fragilis*, the strains from the three host plants gave rise to girdling of the poplar stems or to open wounds (Fig. 3A and 3B; Table 5) and caused symptoms of dieback on the young twigs of the willows, just as was observed in the field after natural infection. A difference in virulence between the strains was due to the length of the period during which a strain was kept in pure culture. After a passage through a host plant, the virulence increased. New isolations were the most virulent ones.

As strains from different origin did not differ in morphological nor in their parasitic character, it seems justified to consider them all as belonging to one species, which must be named *Septotinia podophyllina* WHETZEL. The name of the conidial state must be *Septotis podophyllinum* (ELL. & EV.) v. ARX. The fungus described by JOHANNES (1951) as *Septogloeum populiperdum* is considered identical with *Septotinia podophyllina* WHETZEL. The leaf symptoms erroneously ascribed to the influence of this fungus by JOHANNES, are probably of a physiogenic character.

The presence of *Septotinia* on poplars in the U.S.A. has been ascribed to importation from Europe (GRAVATT, 1952). However, *Septotinia podophyllina* on *Podophyllum peltatum* was described by ELLIS and EVERHART as early as 1888. This fungus was found in the eastern part of the U.S.A., where the poplar parasite has been found also. It may be possible that the fungus has spread from *Podophyllum* to poplar. MARQUIS' opinion (1955), however, that the fungi are not identical, is not in accordance with this idea. In Europe the fungus was described by MOESZ (1932), nearly half a century later than in the U.S.A.

LITERATUUR

ARX, J. A. VON, – 1957. Revision der zu Gloeosporium gestellten Pilze. Verh. Kon. Ned. Akad. Wetensch., Afd. Natuurk., 2e reeks 51 (3): 1–153.

BUCHWALD, N. F., – 1949. Contr. Dep. Pl. Path. R. Vet. Agr. Coll. Copenh. 32.

BUTIN, H., – 1957. Die blatt- und rindenbewohnenden Pilze der Pappel unter besonderer Berücksichtigung der Krankheitserreger. Mitt. biol. Bundesanst. Land- und Forstwirtsch. 91: 1–64.

ELLIS, J. B. & B. M. EVERHART, – 1888. New species of fungi from various localities. J. Mycol. 4: 97–107.

ENDE, G. VAN DEN, – 1952. Een bladvlekkenziekte voorkomend op de populieren, veroorzaakt door Septotinia populiperda Waterman & Cash. T. Pl.-ziekten 58: 54–59.

ENDE, G. VAN DEN, – 1954. Het parasitaire karakter van Septotinia populiperda Waterman & Cash. T. Pl.-ziekten 60: 253–255.

GRAVATT, G. F., – 1952. Diseases of chestnut and poplar in Europe. O.E.E.C. Publ. Paris.

JOHANNES, H., – 1950. Ein Pappelsterben, hervorgerufen durch den Pilz Septogloeum populiperdum sp. n. Nachr.-Bl. dtsch. Pfl.-Sch.-D. (Braunschweig) 2: 67–69.

Johannes, H., – 1951. Septogloeum populiperdum sp. n. als Erreger eines Pappelsterbens Phytopath. Z. 17: 406–410.
Marquis, R. W., – 1955. Ann. Rep. 1954 Northeast. For. Exp. Sta. Upper Darby, Penn.
Moesz, G. von, – 1932. Neue Pilze aus Lettland II. Mitteilung Magyar botanikai Lapok 31: 37–43.
Schmidle, A., – 1953. Über eine Blattkrankheit der Pappel. Nachr.-Bl. dtsch. Pfl.-Sch.-D. (Braunschweig) 5: 81–83.
Schmidle, A., – 1955. Über Infektionsversuche mit Septotis populiperda Waterman & Cash on Populus deltoides. Angew. Bot. 29: 14–25.
Schwenke, H. J., – 1957. Beiträge zur Biologie und zum Parasitismus von Septotis populiperda Waterman & Cash. Diss. Göttingen (niet gepubl.).
Schwenke, H. J., – 1959. Untersuchungen über Sporenkeimung und Myzelwachstum von Septotis populiperda Waterman & Cash. Phytopath. Z. 35: 389–400.
Smarods, J., – 1932. Materali Latvijas mikoflorai. Latvijas augu aizsardzibas instituta raksti 2: 44–51.
Waterman, A. M. & E. K. Cash, – 1950. Leaf blotch of poplar caused by a new species of Septotinia. Mycologia 42: 374–384.
Whetzel, H. H., – 1937. Septotinia, a new genus of the Ciborioideae. Mycologia 29: 128–146.

T. Pl.ziekten 66 (1960): 281–287

STUDIES OF YIELD LOSSES I. THE SELF-LIMITING EFFECT OF INJURIOUS OR COMPETITIVE ORGANISMS ON CROP-YIELD[1, 2]

Met een samenvatting: Studiën over oogstverlies I. Het effect van concurrentie tussen schadelijke organismen bij toenemend aantal

BY

S. H. JUSTESEN[3] and P. M. L. TAMMES[4]

INTRODUCTION

An increase in the initial number of injurious organisms or local infections is not necessarily followed by a proportionate loss in yield of the crop involved. The effect per individual decreases as the numbers increase and thus is density dependent. This phenomenon has been observed with root eelworms where crop yield or growth varies inversely with the logarithm of the initial population level (JONES, 1956, 1957, for *Heterodera schachtii* SCHM.; LOWNSBERY & PETERS, 1955, for *H. tabacum* LOWNSBERY & LOWNSBERY). For the Hessian fly it was described by HILL, UNDINE and PINCKNEY (1943) in relation with the number of puparia per wheat culm.

A similar phenomenon can also be observed for competition between plants of the same species in spacing experiments on crop plants (e.g. DUNCAN, 1958, for maize).

The principle of the self-limiting effect is discussed below with the aid of four hypothetical models representing natural phenomena in such a way that the effects may be assessed mathematically. In all examples it is supposed that the organisms do not migrate to other plant parts, once they are settled.

In another paper the reaction of the plants to the rate of injury will be discussed by the second author.

MODEL I

In Fig. 1 a rootlet is infected simultaneously at the places A, B and C. Each infection is capable of killing the root at the point of infection. Because of its position the infection at A overrules the other two and the length of the remaining healthy portion depends on the point of infection that is farthest away from the root tip. If the chance of infection at a point within a given interval is proportional to the length of the interval the following relation is established:

$$R = \frac{L}{n + 1},$$

where R is the remaining healthy part of the rootlet, L the initial length of the rootlet and n the number of infections per rootlet.

[1] Accepted for publication 9 September, 1960.
[2] For the mathematics the reader is referred to the appendix.
[3] Centre of Mathematics in Agriculture, Wageningen.
[4] Plant Protection Service, Wageningen.

In Fig. 2, R expressed as a percentage of L is plotted against n.

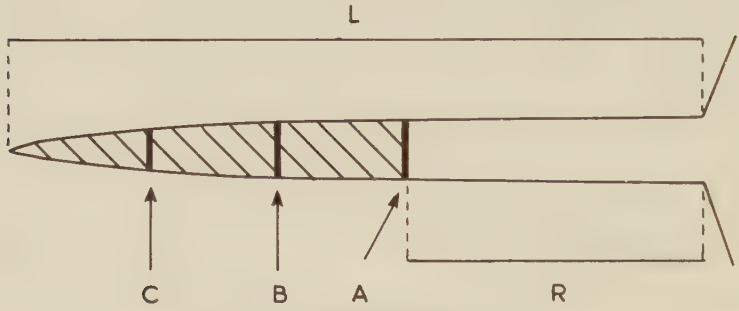

Fig. 1. For explanation see text.

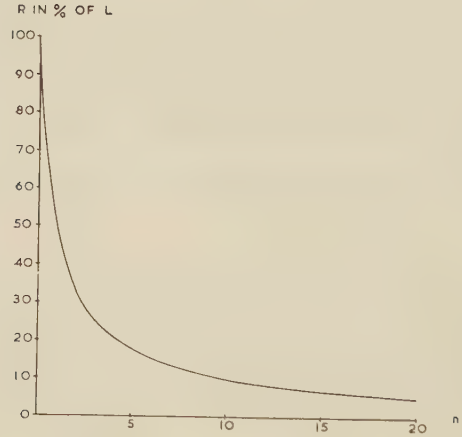

Fig. 2. For explanation see text.

Model II

Suppose that seeds are attacked at random by larvae of beetles, e.g. beans by *Acanthoscelides obtectus* Say. When there are the same number of seeds and larvae, most seeds will be invaded by one larva, some by two and even a few by three larvae or more, but there will be a number of seeds that are free from infection. The chances for each seed being attacked by a larva are supposed to be equal, regardless of the results of former attacks. Then the expected percentage of uninfected seeds can be approximated by:

$$2.718^{-\alpha} \times 100,$$

both the number of seeds n and of larvae r being large and $\alpha = \frac{r}{n}$.

In Fig. 3 the relation between the percentage of healthy seeds and the number of beetles per 100 seeds is graphically represented.

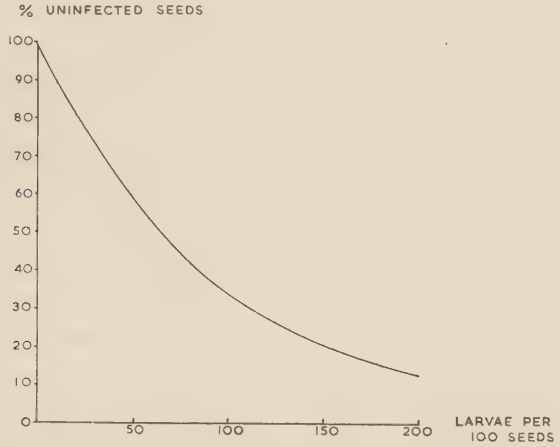

Fig. 3. For explanation see text.

Fig. 4. For explanation see text.

Model III

Suppose that leafspots of a definite size caused by an infection overlap when present in large numbers (Fig. 4). If again the chances of infection within a given leaf area is proportional to the area regardless of former infections, the leaf spots will overlap and the expected non-damaged area may be shown to be:

$$r \times (1 - \alpha)^n,$$

where r is the remaining free leaf surface and $\alpha = \frac{s}{m}$, s being the surface area of a spot and m the surface area of a leaf and n the number of spots per leaf. This formula was developed for bombing patterns during the war (Garwood, 1947).

Graphic representation between r, expressed as a percentage, and n is given in Fig. 5 for spots, each of which covers 1/10 of the area of a leaf.

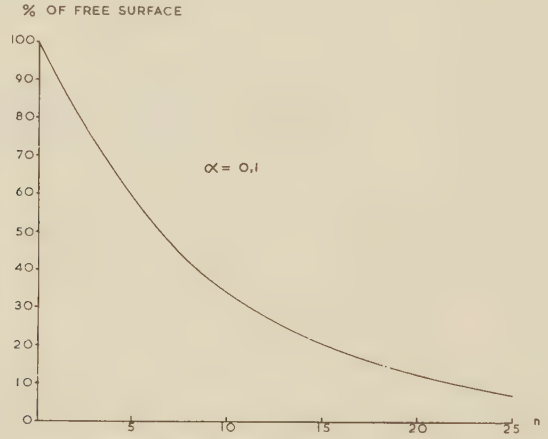

Fig. 5. For explanation see text.

Model IV

In spacing experiments with crops, the yield per square metre increases in proportion to the number of plants per unit area as long as there is ample spacn for development of each plant. However, as soon as plants are in competitioe for soil space, water or light the yield per square metre is the same for quite a wide range of plant population densities. For peas, Riepma (1953) observed that the total yield per unit area did not change over the range from 25 to 167 plants per square metre. Over this range yield of individual plants is directly proportional to the surface area they occupy.

Not taking in account possible yield depressions due to very dense planting,

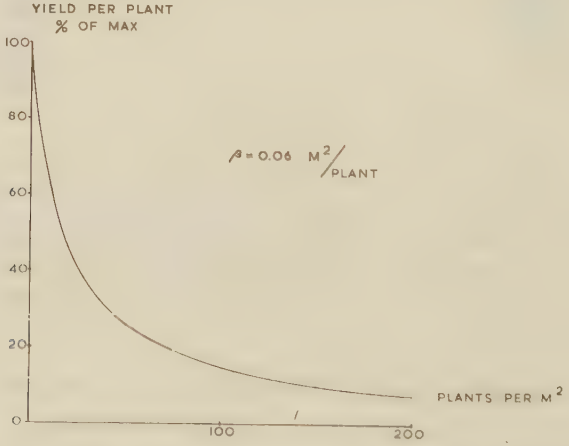

Fig. 6. For explanation see text.

DE WIT (1960) used the following formula for the relation between the yield per plant *(a)* and the number of plants per square metre *(n)*:

$$a = \frac{\beta}{\beta n + 1} \Omega,$$

in which Ω is the (extrapolated) yield per unit area at very high plant densities and $\beta\Omega$ the extrapolated yield of one plant growing far apart from any other plant.

A graphic representation of the yield per plant in relation to the number of plants per square metre is given in Fig. 6.

It is often not realised that, when the area occupied by a plant becomes smaller, its influence on its neighbours decreases and this, in fact, can be the self-limiting effect of increasing population density. Similarly, the effect of ten weeds on a surface area may be much smaller than ten times the effect of a single weed in the same area.

Discussion

The above mentioned models and their mathematical formulae show how competitive forces may act and limit the effect of increasing numbers of injurious organisms or infections. The harmful effect of the individual decreases as their numbers increase and, as a result, the linear correlation between numbers and injury may decrease as high population densities occur. Intraspecific competition not only reduces the effect upon yields, but may also affect the injurious organisms themselves, e.g. by decreasing their rate of multiplication, so reducing the final population. The multiplication rate of *Heterodera rostochiensis* WOLL. is strongly limited at high densities of eelworm populations (OOSTENBRINK, 1950). HESLING (1957) has also observed that the multiplication rate (cyst efficiency) of *Heterodera avenae* WOLL. decreased with an increase in the eelworm population as also has JONES (1956) for *Heterodera schachtii* SCHM.

In nematodes, competition not only causes death of individuals, it may also affect the sex ratio (ELLENBY, 1954; TRIANTAPHYLLOU & HIRSCHMANN, 1959).

The question of multiplication is obvious in spacing experiments as a density dependent factor.

Summary

Four hypothetical models illustrate how competition between pathogens diminishes the effect of individuals as numbers increase. As a result the relation between crop yield or growth and the initial population level is not linear. The effect on yield falls off as the initial population increases or when graphed the yield curve tends to become horizontal.

Samenvatting

Aan vier modellen wordt duidelijk gemaakt, hoe concurrentie tussen schadelijke organismen de invloed van het individu op de waardplant kan verminderen. Als gevolg daarvan zal de relatie tussen het aantal organismen en de oogstderving of de groei niet rechtlijning zijn. Het effect wordt relatief minder als het aantal schadelijke organismen stijgt. In een grafiek heeft de lijn de neiging om horizontaal te worden bij hogere aantallen organismen, bijvoorbeeld fig. 6 (oogst verticaal, schadelijke organismen horizontaal).

Acknowledgements

The authors are indebted to Dr. J. W. Hes, Mr. J. J. Hesling, Mr. F. G. W. Jones, Dr. Ir. M. Oostenbrink and Dr. C. T. Wit for suggestions and reading through the script.

Appendix

Model I: We are given a line of lenght L with n points chosen at random on the line, and assume that the stochastic variable $\underline{x}_i$, the distance of point i from an endpoint, has a rectangular distribution.

If the first point chosen is $\underline{x}_1$ the expectation of $\underline{x}_1$, under the condition that $\underline{x}_2, \ldots \underline{x}_n$, are all smaller or equal to $\underline{x}_1$, is:

$$E(\underline{x}_1) = \int_0^L \frac{\underline{x}_1}{L} d\underline{x}_1 \int_0^{x_1} \frac{dx_2}{L} \cdots \int_0^{x_1} \frac{dx_n}{L} = \int_0^L \frac{x_1}{L} dx_1 \left[\int_0^{x_1} \frac{dx_i}{L} \right]^{n-1} = \frac{1}{L^n} \int_0^L x_1^n \, dx_1 = \frac{L}{n+1} .$$

However, we want the expectation of $\underline{x}_i$ regardless of the value of i and as every $\underline{x}_i$ has equal chance of taking the largest value we obtain

$$E(\underline{x}) = \frac{n}{n+1} L \quad \text{and} \quad E(R) = L - \frac{n}{n+1} L = \frac{L}{n+1} .$$

Model II: This model is analogous to the so-called occupancy problem which may be stated as follows:

r marbles are distributed over n boxes in such a way that every marble has an equal chance of going into any one of the n boxes.

What is the probability that m boxes remain empty? What is the expectation of the number of empty boxes?

The solution, the derivation of which is somewhat lengthy, is given by Feller (1957, pg. 58).

$$P_m(r, n) = \binom{n}{m} \sum_{v=o}^{n-m} (-1)^v \binom{n-m}{v} \left(1 - \frac{m+v}{n}\right)^r .$$

The expectation is obtained by multiplying $P_m(r, n)$ by n^r. In the biological problem we are interested in the case that both r and n are large and $r/n = \alpha$ (constant). In that case the distribution approximates the Poisson with $\lambda = ne^{-\frac{r}{n}}$ expected number of empty boxes. The percentage empty boxes is then $100\, e^{-\frac{r}{n}}$.

Model III: Let the area of the leaf be m cm² and the area of the leafspot caused by one infection s cm², and $s/m = \alpha$. The probability that a given point A is outside the area damaged by the first infection is $(1 - \alpha)$; the probability that it is outside the total area damaged by n infections is $(1 - \alpha)^n$ which is then the expected proportion of the leaf that is undamaged.

Clearly the percentage damage depends on α. If α is not small, it is not permissible to neglect the influence of the margin of the leaf as has been done in the above.

References

Duncan, W. G., – 1958. The relationship between corn populations and yield. Agron. J. 50: 82–84.

Ellenby, C., – 1954. Environmental determination of the sex ratio in a plant parasitic nematode. Nature 174: 1016.

Feller, W., – 1957. An introduction to probability theory and its applications. New York-London.
Garwood, F., – 1947. The variance of overlap of geometrical figures with references to a bombing problem. Biometrica 34: 1–18.
Hesling, J. J., – 1957. Heterodera major on cereals. Nematologica 2: 285–299.
Hill, C. C., E. J. Undine & J. S. Pinckney, – 1943. A method for estimating reduction in yield of wheat caused by Hessian fly infestations. U.S. Dept. Agr., Circ. 663.
Jones, F. G. W., – 1956. Soil populations of beet eelworms, Heterodera Schachtii Schm. in relation to cropping. II. Microplot and field plot results. Ann. appl. Biol. 44: 25–56.
Jones, F. G. W., – 1957. III. Further experiments with microplots and with pots. Nematologica 2: 257–272.
Lownsbery, B. F., & B. G. Peters, – 1955. The relation of the tobacco cyst nematode to tobacco growth. Phytopathology 45: 163–169.
Oostenbrink, M., – 1950. Het aardappelaaltje. Diss. Wageningen.
Riepma, P. Wzn, – 1953. Proeven over plantgetal en rijenafstand bij erwten. Versl. CILO., Nr. 38. Wageningen.
Triantaphyllou, A. C. & A. C. Hirschmann, – 1959. Development and sex determination in Meloidogyne incognita and intersexuality in M. javanica. Phytopathology 49: 552–553.
Wit, C. T. de, – 1960. On competition. Versl. Landb. Onderz., Netherlands 66-8.

T. Pl.ziekten 66 (1960): 288–294

EEN VIRUS IN *ATROPA BELLADONNA*[1]

With a summary: A virus in Atropa belladonna

DOOR

L. C. P. KERLING en D. H. BRANTS[2]

Phytopathologisch Laboratorium „Willie Commelin Scholten", Baarn

INLEIDING

Op een terrein te Baarn, dat geregeld in gebruik is voor het kweken van groenten en sierplanten, werd *Atropa belladonna* L. uitgeplant. Elk voorjaar en iedere zomer vertonen de bladeren dezer planten een mozaïekachtige verkleuring, waarbij het bladoppervlak enigszins bobbelig wordt en een lichte bladmisvorming kan optreden. De bladrand kan onregelmatig ingesnoerd zijn. Oudere bladeren en stengels vertonen soms chlorotische vlekken met necrotische centra. De symptomen komen overeen met die beschreven door SMITH (1946, 1957), veroorzaakt door „*Belladonna* mosaic virus".

Om na te gaan of het virus, dat de symptomen bij *Atropa* in Engeland veroorzaakt, identiek is met het agens dat in Baarn bij deze plant de ziekte veroorzaakt, werden inoculaties uitgevoerd met perssap van zieke *Atropa*-planten. Het sap werd na filtreren door kaasdoek verdund met water, met een natriumsulfiet- of met een fosfaatoplossing.

Bladeren van toetsplanten behorend tot de Solanaceae werden hiermee ingewreven, evenals enkele niet tot deze familie behorende planten. De geïnoculeerde planten waren opgekweekt in de kas bij een temperatuur van 18° tot 23° C. Ook werden stengels van zieke *Atropa*-planten geënt op onderstammen van planten, behorend tot de Solanaceae.

DE SYMPTOMEN OP HET TOETSSORTIMENT

De inoculaties met perssap, waaraan een buffer was toegevoegd, slaagden beter dan die met ongebufferd perssap. Op de volgende planten waren soms na drie, maar altijd na zes dagen, duidelijke ziektesymptomen waarneembaar op de geïnoculeerde bladeren, terwijl later de ziekte systemisch werd.

Atropa belladonna L. De boven beschreven symptomen ontwikkelden zich ook op planten opgekweekt in de kas. De chlorotische vlekjes, die na vijf dagen zichtbaar werden, kregen later een necrotisch centrum (fig. 1).

Capsicum annuum L. Necrotische vlekken en strepen op de bladeren ontstonden reeds drie tot vijf dagen na de inoculatie. Zij breidden zich uit langs de nerven tot op de stengel, waarna de aangetaste bladeren afvielen. Ook de jonge bladeren vertoonden later necrotische vlekjes. De planten bleven achter in ontwikkeling vergeleken met de controle-planten.

Hyoscyamus niger L. Ook hier ontstonden op de oudere bladeren chloroti-

[1] Aangenomen voor publikatie 9 sept. 1960.

[2] Met medewerking van Mevr. J. M. DEKHUYZEN-MAASLAND, Dr. S. GAYED (Karthoum), Mej. C. VAN HEUVEN, C. DE VOOYS en Mej. R. VAN WESSEM.

sche vlekken met een necrotisch centrum, maar de jonge bladeren vertoonden een duidelijk mozaïek, gepaard gaande met een licht worden van de nerven. De chlorosen overheersten hier de necrosen.

Nicandra physaloides GAERTN. De geïnoculeerde bladeren vormden anthocyaan, waarna zij necrotisch werden en afvielen. De jonge bladeren vertoonden na acht dagen chlorosen en necrosen en waren sterk misvormd. Ook de stengel werd necrotisch. De planten bleven sterk in groei achter vergeleken met de controle-planten.

Nicotiana glutinosa L. Op de oudere bladeren ontstonden massieve of ringvormige, necrotische vlekken, die zich langs de nerven uitbreidden tot zelfs in de niet geïnoculeerde bladeren. De planten stierven snel af.

Nicotiana tabacum L. var. Samsun en White Burley. Ook hier traden na inoculatie 1 tot 15 mm grote, lokale lesies op in de vorm van bogen, halvemaanvormige figuren of ringen, terwijl de necrosen zich vaak langs de nerven voortzetten. Er ontstonden dan eikebladachtige tekeningen op de bladeren. Ook de nerven zelf konden necrotisch worden. Bij toedienen van virus in hoge concentratie ontstonden voornamelijk scherp afgegrensde vlekken in zo grote getale, dat zij elkaar raakten. Ook op de zich later ontwikkelende bladeren ontstonden dan necrosen. De planten stierven soms af. Bij toedienen van een lagere virusconcentratie nam het aantal lokale lesies af, maar de necrosen verspreidden zich nu langs de nerven tot in de stengel (fig. 2).

Petunia hybrida. Er ontstonden necrotische strepen en kringen op bladeren en stengel. De bladeren waren vervormd.

Physalis floridana RYDB. Reeds twee dagen na de inoculatie traden chlorosen en necrosen op bij de behandelde bladeren, die daarna afvielen. Na negen tot tien dagen werd de ziekte systemisch. Er was een sterke anthocyaanvorming en ook ontstonden er necrosen. De zieke planten bleven kleiner dan de gezonde.

Nicotiana tabacum var. Samsun bleek een goede toetsplant, daar na inwrijven met verdund, infectieus perssap de lokale lesies afzonderlijk geteld konden worden.

De volgende planten bleken 14 dagen na de inoculatie met perssap van zieke *Atropa*-planten veel virus te bevatten: *Hyoscyamus niger*, *Nicandra physaloides*, *Petunia hybrida* en *Physalis floridana*. Ook in de wortels en in het vruchtvlees van zieke *Atropa*-planten was een zeer hoge virusconcentratie aanwezig. Een hoog virusgehalte werd ook gevonden in *Datura stramonium* L., die na inoculatie slechts onduidelijke symptomen vertoonde. Het virusgehalte was eveneens hoog in *Solanum nigrum* L., waarvan de bladeren geen andere symptomen te zien gaven dan een onregelmatige vorming van anthocyaan. De geïnfecteerde planten van *Capsicum annuum*, die hevige symptomen vertoonden, bleken daarentegen slechts weinig virus te bevatten.

De volgende planten vertoonden na inoculatie geen symptomen: *Solanum lycopersicum* L., *Gomphrena globosa* L., *Cucumis sativus* L., *Chenopodium album* L., *Spinacia oleracea* L., *Zea mays* L. en *Phaseolus vulgaris* L. var. Beka. Waarschijnlijk bevatten zij ook geen virus, daar met het perssap op tabak geen symptomen konden worden teweeggebracht.

Met sap van zieke *Petunia*- en tabaksplanten werden gezonde *Atropa*-planten geïnoculeerd, die na vijf tot zes dagen de oorspronkelijke symptomen vertoonden. Dit gebeurde ook, als het virus achtereenvolgens door verschillende waardplanten gevoerd werd, b.v. van *Atropa* via *Physalis* en *Petunia* of tabak weer naar

Atropa terug.

Ook door enten kon het virus overgebracht worden: een geïnfecteerde stengeltop van *Atropa*, geënt op een gezonde *Atropa*-onderstam of op een *Physalis*-onderstam, deed deze ziek worden.

De bepaling van het verdunningseindpunt en de inactiveringstemperatuur

Sap van op natuurlijke wijze geïnfecteerde *Atropa*-planten werd met water verdund en uitgewreven op *Nicotiana glutinosa* en op *Capsicum annuum*. Een verdunning van 1 : 10 gaf nog symptomen op deze waardplanten, een verdunning van 1 : 100 nog op *Nicotiana tabacum* var. White Burley. Sap uit 16 dagen van te voren geïnoculeerde *Hyoscyamus*-planten gaf nog op alle toetsplanten, inclusief *Hyoscyamus* zelf, symptomen bij een verdunning van 1 : 1000. Een verdunning van 1 : 10.000 deed zelfs nog symptomen op Samsun-tabak ontstaan. Het verdunningseindpunt van het virus zal, althans bij *Hyoscyamus*, tussen 10^{-3} en 10^{-4} liggen.

De inactiveringstemperatuur ligt tussen 70° en 80 °C. Toen gebleken was dat het virus het karakter had van een bodemvirus, werd de inactiveringstemperatuur van besmette grond bepaald. Na verhitting van grondmonsters binnen een bepaald temperatuurtraject, resp. bij 50 tot 60°, 60 tot 70° en 70 tot 80 °C, bleek in het laatste geval het virus in de grond geïnactiveerd te zijn.

Vorm en afmeting van de virusdeeltjes

Elektronenfoto's[1] werden gemaakt van bloedingssap van zieke *Nicandra*-planten. De virusdeeltjes zijn staafvormig en van ongelijke lengte, vaak geknikt. Het beeld vertoont grote overeenkomst met dat van ratelvirus (van der Want & Rozendaal, 1948).

Het transport van het virus in de plant

Als bladeren van tabaksplanten, var. Samsun, gegroeid in „gezonde" tuingrond, werden ingewreven met perssap van zieke *Atropa*-planten, bleken ook de wortels na verloop van tijd virus te bevatten (tabel 1).

Tabel 1. Aantal dagen nodig voor het transport van *Atropa*-virus van de bladeren naar het wortelstelsel bij Samsun-tabak.
Number of days needed for transport of Atropa-*virus from the leaves to the root-system of Samsun-tobacco.*

Tijd na inoculatie in dagen *Time in days after inoculation*	Aantal uitgewreven wortelstelsels *Number of tested root systems*	Aantal toetsplanten met symptonen[2] *Number of testplants with symptoms*[2]
8	5	1/5
10	4	1 4
13	4	0/4
15	4	3/4
17	4	2 4

[1] Hiervoor onze dank aan Prof. Dr. L. H. Bretschneider, directeur van het „Centrum voor Submicroscopisch Onderzoek van Biologische Objecten" van de Rijksuniversiteit te Utrecht.

[2] Teller: aantal toetsplanten met symptomen. *Numerator: number of testplants with symptoms.* Noemer: totaal aantal toetsplanten. *Denominator: total number of testplants.*

In tabaksplanten had dus virustransport van de bladeren naar de wortels plaats.

Na dompelen van wortelstelsels van gezonde tabaksplanten in infectieus sap, bleken na uitplanten in gestoomde grond wel de wortels na verloop van tijd geïnfecteerd te zijn, maar niet de bovengrondse delen. In tabak scheen geen virustransport plaats te vinden van de wortels naar de bladeren. Waren *Atropa*-planten met de wortels in infectieus sap gedompeld, dan vertoonden de bladeren na verloop van tijd wel ziektesymptomen. Hier had blijkbaar wel virustransport in bovenwaartse richting plaatsgevonden.

Kunstmatig geïnfecteerde *Atropa*-planten werden opgekweekt in van te voren gestoomde grond. Deze zieke planten werden verwijderd en vervangen door gezonde tabaksplanten. Na twee maanden vertoonden de bladeren hiervan geen symptomen, maar het perssap uit de wortels bevatte virus. Door het opkweken van de zieke *Atropa*-planten was de gestoomde grond dus besmet geraakt, evenals de tabakswortels.

Infectie van planten in besmette grond

Het was duidelijk geworden, dat het wortelstelsel van gezonde tabaksplanten, die in besmette grond werden overgezet, vrij snel met virus besmet werd. Deze grond was afkomstig van een terrein, waarop reeds gedurende enkele jaren zieke *Atropa*-planten gekweekt waren.

Op verschillende manieren werd getracht een inzicht te verkrijgen in de wijze, waarop een infectie tot stand zou kunnen komen. Uit de geïnfecteerde wortels

Tabel 2. Aantal toetsplanten van *Nicotiana tabacum* met symptomen na inoculatie met perssap van wortels van planten, die een aantal dagen in besmette grond hadden gestaan.
Number of Nicotiana tabacum *testplants developing symptoms after inoculation with rootsap of plants, grown in infested soil for various periods.*

Tijd in dagen in besmette grond *Time in days in infected soil*	Planten met symptomen[3] *Plants with symptoms*[3]
0[1]	0/5
1	0/10
2	2/10
4	3/10
6	6/10
8	7/10
11	7/10
14	7/10
0[2]	0/5

[1] 5 controle-planten, waarvan perssap uit de wortels op toetsplanten werd uitgewreven vóór de proef.
5 control plants from which rootsap was tested on tobacco leaves at the beginning of the experiment.

[2] Idem na de proef.
The same after the experiment.

[3] Teller: aantal toetsplanten met symptomen.
Noemer: totale aantal toetsplanten.
Numerator: number of testplants with symptoms.
Denominator: total number of testplants.

werden talrijke micro-organismen geïsoleerd en in reincultuur gebracht. Suspensies hiervan werden op tabaksbladeren uitgewreven, echter zonder enig gevolg. Ook schimmels, geïsoleerd uit wortels van jonge, aanvankelijk steriel opgekweekte tabaksplantjes die in besmette grond waren overgezet, werden op aanwezigheid van virus getoetst, doch zonder resultaat.

Nagegaan werd vervolgens, hoeveel tijd na het overplanten van gezonde planten in besmette grond het virus in de wortels aangetoond kon worden. Tabaksplanten werden in het vijfbladig stadium in besmette grond overgezet, waarin zij één of meer dagen bleven, alvorens het wortelstelsel werd uitgeperst. Met het perssap werden gezonde tabaksplanten geïnoculeerd. Voor en na de proef werden de wortels van de controle-planten eveneens op virus getoetst (tabel 2). Ook werd nagegaan of de nog aan de wortels van de planten uit de besmette grond hangende aardedeeltjes een infectie op de toetsplanten teweeg konden brengen. Dit bleek niet het geval te zijn.

Twee dagen na het overplanten in besmette grond bleken in enkele gevallen gezonde wortels al geïnfecteerd te zijn. Het was de vraag, hoe dit geschiedde: zou het virus binnen kunnen komen door schuren langs gronddeeltjes, waaraan het virus gebonden was of zouden vectoren aanwezig zijn? In het eerste geval zou men kunnen denken, dat het de jonge worteltopjes moesten zijn, die na het overplanten uitgroeien en contact maken met de bodemdeeltjes. Daarom werd nu de volgende proef uitgevoerd. Gezonde planten werden uitgeplant in viruszieke grond. Twee tot drie dagen later werden er planten uit de grond genomen. Van telkens acht planten werd het wortelstelsel goed schoongespoeld en uitgeperst, waarbij een scheiding gemaakt werd tussen de oude wortels, die reeds vóór het uitplanten aanwezig waren en de jonge, in de zieke grond gevormde toppen. Na inoculeren met de oude wortelstelsels bleek 50% van de toetsplanten symptomen te vertonen als de wortels twee dagen en 75% als de wortels drie dagen in besmette grond hadden gestaan. De toetsplanten, geïnoculeerd met perssap van jonge worteltoppen die zich in twee dagen in besmette grond ontwikkeld hadden, vertoonden geen symptomen. Wel was dit het geval met sap uit jonge worteltopjes, die zich na een verblijf van drie dagen in besmette grond ontwikkeld hadden.

Deze proef werd nog eens herhaald, waarbij van telkens 10 tabaksplanten, aanvankelijk opgekweekt in steriele grond, de wortelstelsels werden uitgeperst nadat de planten gedurende nul, een, twee of meer dagen in besmette grond gestaan hadden. Het perssap werd op telkens 10 gezonde tabaksplanten uitgewreven. Ook nu bleek, dat wortels van planten reeds twee dagen na het overzetten in besmette grond geïnfecteerd konden zijn.

De mogelijkheid, dat nematoden als vector optreden, werd onderzocht op het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek te Wageningen, onder leiding van Dr. J. W. Seinhorst (Sol, van Heuven & Seinhorst, 1960).

Bespreking van de resultaten; vergelijking met ratelvirus

Het in Nederland gevonden virus uit *Atropa belladonna* is naar alle waarschijnlijkheid identiek met het door Smith (1946, 1957) beschreven „*Belladonna* mosaic virus". De symptomen op verschillende waardplanten komen volgens de beschrijvingen goed overeen. Wel bleken nog andere Solanaceae dan die door Smith genoemd, waardplanten voor het virus te kunnen zijn en wel: *Nicandra*

physaloides, *Physalis floridana*, *Petunia hybrida* en *Capsicum annuum*. Het verdunningseindpunt en de inactiveringstemperatuur bleken overeen te komen.

Elektronenfoto's van het *Atropa*-virus gaven grote overeenkomst te zien met foto's van een stam van ratelvirus, ontvangen uit Wageningen.[1] Symptomen, veroorzaakt door het *Atropa-belladonna*-virus, werden vergeleken met die, welke door deze stam van het ratelvirus veroorzaakt werd.

Het bleek nu, dat ook het *Atropa*-virus via de grond op gezonde tabaksplanten kan overgaan. Reeds twee dagen nadat gezonde tabaksplanten in besmette grond overgezet waren, kon het virus in de wortels worden aangetoond.

Op Samsun-tabak en op *Atropa* waren de symptomen, veroorzaakt door dit virus, vrijwel identiek met die veroorzaakt door het ratelvirus. *Hyoscyamus niger* reageerde echter op het ratelvirus met vrij sterke necrosen, waarbij de planten tenslotte afstierven, terwijl het *Atropa*-virus op deze planten in hoofdzaak chlorotische verschijnselen en mozaïek veroorzaakte. Ook *Nicandra* en *Physalis* reageerden op het ratelvirus heviger dan op het *Atropa*-virus. Terwijl tabak in ratelzieke grond ook bovengronds hevige symptomen kan vertonen, gebeurde dit in *Atropa*-zieke grond niet. Toch lijkt het *Atropa*-virus sterk verwant met het ratelvirus, misschien moet het zelfs als een stam van dit virus beschouwd worden.

Summary

In a garden at Baarn, The Netherlands, *Atropa belladonna* plants, grown from seed, showed symptoms similar to those described by Smith (1946, 1957) for „*Belladonna* mosaic". After inoculation of solanaceous test plants with sap from diseased plants, the following species showed symptoms: *Atropa belladonna* L., *Capsicum annuum* L., *Hyoscyamus niger* L., *Nicandra physaloides* Gaertn., *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana tabacum* L. var. Samsun, *Petunia hybrida* and *Physalis floridana* Rydb. The symptoms suggest that the virus may be identical with that described by Smith. A high virus concentration was found in *Hyoscyamus niger*, *Nicandra physaloides*, *Petunia hybrida*, *Physalis floridana*, in the roots and the pericarp of diseased *Atropa* plants, and also in *Solanum nigrum* L. and *Datura stramonium* L. The latter two species showed hardly any symptoms. A low virus concentration was found in *Capsicum annuum*, though this plant showed severe symptoms.

The dilution end point of the virus was between 10^{-3} and 10^{-4}; virusinactivation occurred between 70° and 80 °C.

In electron micrographs the rod-shaped virus particles appeared similar to those of rattle virus.

Virus could be detected in the roots of tobacco plants after the leaves had been inoculated with sap of diseased *Atropa*-plants (Table 1). The reverse did not occur. Following immersion of the roots of tobacco plants in virus-containing sap these plants were potted in steamed soil. Subsequently the roots proved to be infected but the stems and leaves contained no virus. However, *Atropa* plants treated in the same way, did show leaf symptoms.

It appeared, that the roots of young, healthy tobacco plants could become infected with virus, when grown in naturally infested soil for only two days

[1] Hiervoor onze dank aan Mej. J. Dijkstra, Laboratorium voor Virologie van de Landbouwhogeschool te Wageningen.

(Table 2). Fungus cultures isolated from diseased roots did not show any infectivity. Nematodes are probably the vectors of this virus (Sol, Van Heuvel & Seinhorst, 1960).

Literatuur

Sol, H. H., J. C. van Heuven and J. W. Seinhorst, – 1960. On the transmission of rattle virus and Atropa belladonna virus by Nematodes. T.Pl.-ziekten 66: 228–231.

Smith, K. M., – 1946. Virus diseases of farm and garden crops. Worcester: 1–111.

Smith, K. M., – 1957. A textbook of plant virus diseases, 2nd ed., London.

Want, J. P. H. van der & A. Rozendaal, – 1948. Electronen-microscopisch onderzoek van het virus, dat de ratelziekte van de tabak en het stengelbont van de aardappel veroorzaakt. T. Pl.-ziekten 54: 134–141.

FIG. 1. *Atropa belladonna*
a. gezond blad *healthy leaf*
b. blad geïnfecteerd met *Atropa-belladonna*-virus
leaf infected with Atropa belladonna *virus*

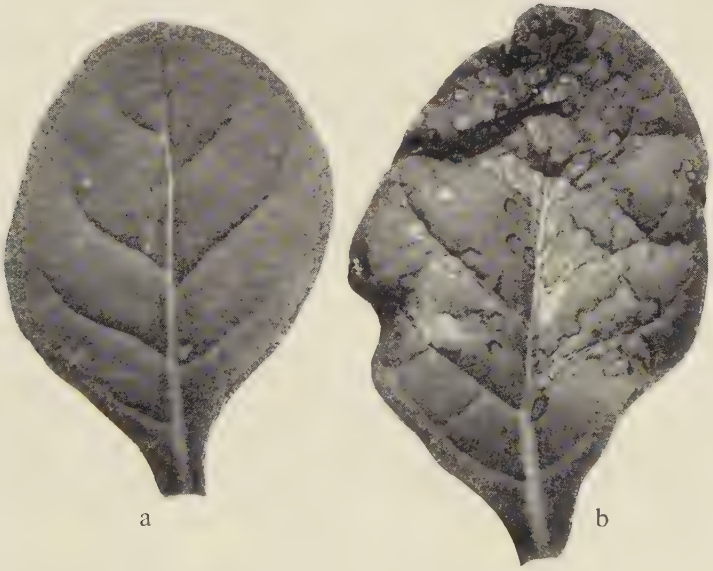

FIG. 2. *Nicotiana tabacum* White Burley
a. gezond blad *healthy leaf*
b. blad geïnfecteerd met *Atropa-belladonna*-virus
leaf infected with Atropa belladonna *virus*

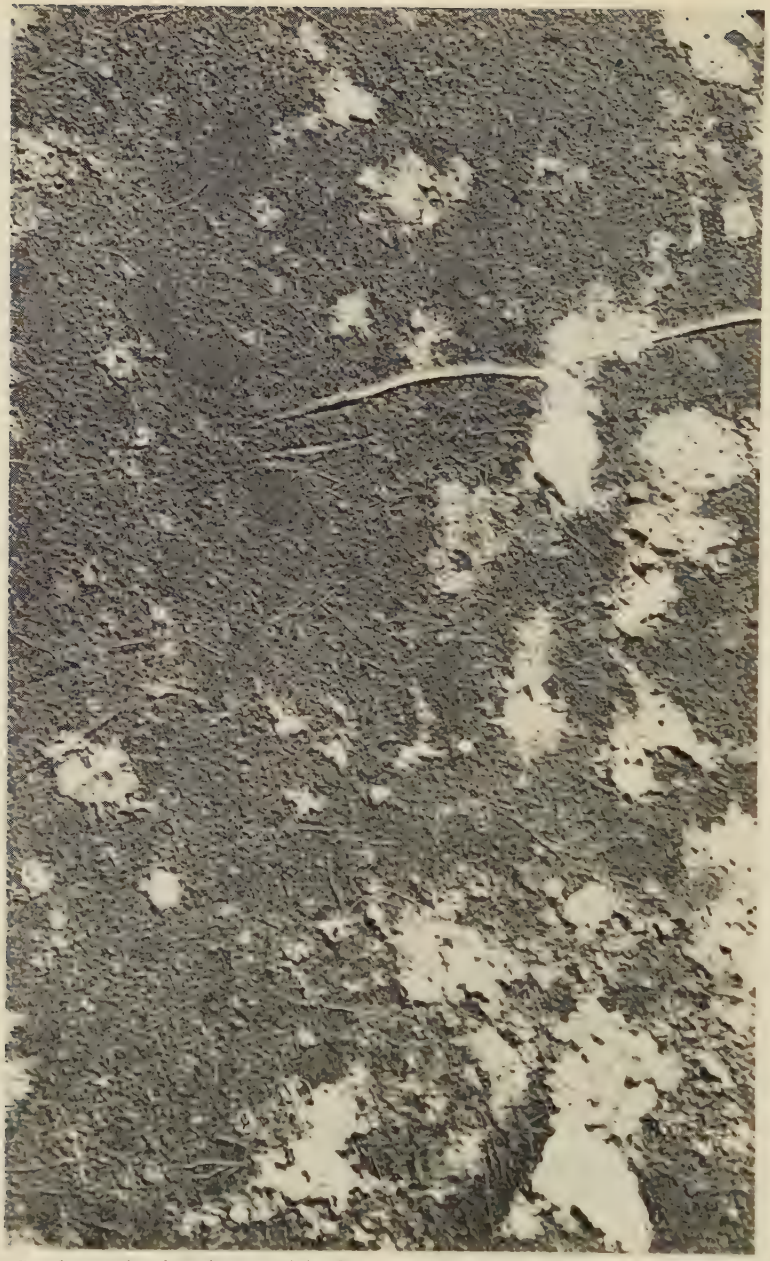

FIG. 1. *Sorghum* red stripe virus particles from *Sorghum halepense*. Magnification: × 12,000; palladium-shadowed.
Photograph Physico-Technical Service for Agriculture, Wageningen.
„Sorghum *red stripe*" *virusdeeltjes uit* Sorghum halepense. *Vergroting* 12.000 ×; *geschaduwd met palladium.*
Foto Stichting Landbouw Fysisch-Technische Dienst, Wageningen.

T. Pl.ziekten 66 (1960): 294–299

SEROLOGICAL AND ELECTRON MICROSCOPICAL INVESTIGATIONS OF THE RELATIONSHIP BETWEEN *SORGHUM* RED STRIPE VIRUS AND SUGAR CANE MOSAIC VIRUS[1]

Met een samenvatting: Serologisch en elektronenmicroscopisch onderzoek naar de verwantschap tussen het „Sorghum red stripe" virus en het suikerrietmozaïekvirus

BY

J. Dijkstra[2] and P. Grancini[3]

Introduction

A disease of *Sorghum* causing mosaic symptoms and red necrotic stripes on the leaves was described by Goidanich in 1938 and 1939 under the name of "arrossamento striato" (red stripe). This author suspected that the disease was due to a virus.

In 1953 the disease again came under investigation. Two years later Grancini found the disease occurring also on maize from fields in the surroundings of Milan, but the symptoms were here weaker than on *Sorghum vulgare*. In addition it appeared possible to transmit the mosaic from the maize plants to various healthy *Sorghum* plants and vice versa. *Sorghum* so infected, developed mosaic and red spots on the leaves. In 1957 Grancini and Lovisolo published independently of each other extensive papers on the mosaic disease of maize and the "arrossamento striato" of *Sorghum*.

Grancini decided that *Sorghum* red stripe and maize mosaic were due to the same virus because of the fact that artificial infections from *Sorghum* with the characteristic symptoms of the red stripe produced the same symptoms on *Sorghum* in the greenhouse as did the virus taken from maize.

In the same article the author also pointed out that there is apparently a close relationship between sugar cane mosaic virus (S.C.M.V.) and *Sorghum* red stripe virus (S.R.S.V.). He mentioned in this connection a publication of Brandes (1920) in which the identity of a mosaic disease of maize and the S.C.M.V. disease was established. Grancini investigated the in vitro characteristics of the maize mosaic virus and found that the data obtained were comparable with those of the S.C.M.V. (thermal inactivation point 53 °C, dilution end-point 10^{-3}–10^{-4}, longevity in vitro 7–15 h. in the case of the mosaic virus from maize). The above mentioned author found also considerable agreement with S.C.M.V. regarding host range.

Lovisolo suggested also a relationship between the *Sorghum* virus and S.C.M.V. on the grounds of certain in vitro characteristics (thermal inactivation point 46–50 °C, dilution end-point 10^{-3}, longevity in vitro 2 h. 40 min.–4 h. 50 min. in

[1] Accepted for publication 15 Sept., 1960.
[2] Laboratorium voor Virologie, Wageningen, The Netherlands.
[3] Stazione Sperimentale di Maiscoltura, Bergamo, Italy.

the case of S.R.S.V.). Dean & Coleman (1959) reported the occurrence of a severe necrosis of *Sorghum* leaves in Mississippi (U.S.A.) caused by S.C.M.V.

In the present publication the relationship between S.R.S.V. from *Sorghum* and maize, and S.C.M.V. from sugar cane is investigated serologically. In addition an electron microscopical examination was made of S.R.S.V. from *Sorghum* and maize, and S.C.M.V. from sugar cane and maize. In view of differences in length given in the literature for S.C.M.V. (620–670 mμ, Gold & Martin, 1955) and S.R.S.V. (750 mμ, Brandes, 1959), the present authors determined at Wageningen under conditions that were as far as possible uniform, the length of S.C.M.V. and S.R.S.V. particles obtained from the above mentioned host plants.

Serological investigation

Materials and methods

The serological tests were carried out using sap from mosaic diseased leaves of *Sorghum halepense* from Italy, from mosaic diseased maize plants inbred line Lo 3 (the seed of which was obtained from Italy, sown in Wageningen and the plants then inoculated with S.R.S.V.) and from sugar cane leaves with S.C.M.V.

Diseased sugar cane sets were obtained from Puerto Rico and subsequently grown at Wageningen. Infective sap from sugar cane, *Sorghum halepense* and maize and healthy sap from maize were expressed through cheese-cloth after grinding in a mortar and centrifuged at 5,000 r.p.m. for 30 minutes. Antisera against S.C.M.V. came from Puerto Rico and had been prepared by injecting rabbits with sap from mosaic diseased maize and sugar cane, according to the method described by Pérez & Adsuar (1954). According to these authors the first lot of antiserum had a titre of 1 : 16 (from sugar cane) and the second of 1 : 8 (from maize).

For the absorption healthy maize sap was mixed with antiserum in the proportion 4 : 1 and kept at room temperature overnight. Next day the suspension was centrifuged at 5,000 r.p.m. for 30 minutes to eliminate any precipitate formed.

Normal serum was treated in the same way for comparison. The sera were then ready for use. In the experiments 2, 3 and 5 antiserum was used without prior absorption.

The serological tests were carried out by means of micro-reaction method under paraffin oil, the so-called microprecipitation reaction (Van Slogteren, 1955). The following tests were carried out:

S.R.S.V. from *Sorghum* with antiserum against S.C.M.V.

S.R.S.V. from maize with antiserum against S.C.M.V.

S.C.M.V. from sugar cane with antiserum against S.C.M.V.

At the same time the necessary control tests were conducted with normal serum, healthy sap and physiologic saline solution. The reactions were judged after 2–6 h. at 37 °C.

Results

The results of the serological tests are given in Table 1. It is evident that in addition to the strong reaction of S.C.M.V. with its homologous antiserum there was also a positive reaction by S.R.S.V. from *Sorghum* and maize against S.C.M.V. antiserum. Since the titre of the S.C.M.V. in experiment 1 differed

TABLE 1. Serological test with S.R.S.V.[1] from *Sorghum* and maize, and S.C.M.V.[2] from sugar cane against S.C.M.V. antiserum.
Serologische proef met S.R.S.V.[1] uit Sorghum *en mais en S.C.M.V.[2] uit suikerriet tegen S.C.M.V.-antiserum.*

Dilutions of antigen / *Verdunningen van het antigeen* — Dilutions of antiserum / *Verdunningen van het antiserum*	S.R.S.V. from *Sorghum halepense* / *S.R.S.V. uit* Sorghum halepense											
	1/1		1/2		1/4		1/8		1/16		1/32	
No. of experiment — *Proefnummer*	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
S.C.M.V. 1/1	+	−	+	−	+	−	++	−	−	−	−	−
1/2	+	+	+	+	−	+	+	−	−	−	−	−
1/4	−	++	−	+	−	+		−	−	−	−	−
1/8	−	++	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−

Dilutions of antigen / *Verdunningen van het antigeen* — Dilutionsofantiserum / *Verdunningen van het antiserum*	S.R.S.V. from maize / *S.R.S.V. uit mais*											
	1/1		1/2		1/4		1/8		1/16		1/32	
No. of experiment — *Proefnummer*	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4
S.C.M.V. 1/1	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−
1/2	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1/4	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1/8	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1/16	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1/32	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

Dilutions of antigen / *Verdunningen van het antigeen* — Dilutions of antiserum / *Verdunningen van het antiserum*	S.C.M.V. from sugar cane / *S.C.M.V. uit suikerriet*											
	1/1		1/2		1/4		1/8		1/16		1/32	
No. of experiment — *Proefnummer*	5	6	5	6	5	9	5	6	5	6	5	6
S.C.M.V. 1/1	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
1/2	++	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
1/4	+++	−	++	−	+	−	+	−	−	−	−	−
1/8	+++	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−
1/16		−		−		−		−		−		−
1/32		−		−		−		−		−		−

[1] *Sorghum* red stripe virus.
[2] Sugar cane mosaic virus.

The antiserum had a titre of 1:8 in the experiments 2–6 and of 1:16 in experiment 1. Healthy sap and normal serum did not give any specific reaction.

Het antiserum had een titer van 1:8 in de proeven 2–6 en van 1:16 in proef 1. Gezond sap en normaal serum gaven geen enkele specifieke reactie.

from that in experiments 2–6, since the concentration of antigen varied with the host and since the antiserum in experiments 2, 3 and 5 was not absorbed, it is not to be expected that the reactions would be quantitatively comparable. Because of the results obtained in experiment 1, the antiserum used in experiments 2–5 was diluted to $^1/_8$ concentration.

The results showed that in spite of the titres given by PÉREZ & ADSUAR perhaps further dilutions could have been applied. Consequently the antiserum in subsequent experiments was diluted to 1/32. The control tests with normal serum, healthy sap and physiologic saline solution in most cases gave a slight milkiness but never a clear flocculent precipitate.

Discussion

The above mentioned experiments show that there is a serological relationship between S.C.M.V. and S.R.S.V. In view of the differences in concentrations of antigen in the different host plants and the dissimilarity of the two antisera lots, it is difficult to decide whether or not a single strain is involved.

Number of particles
Aantal deeltjes
Sugar cane mosaic virus from sugar cane
Suikerriet mozaiek virus uit suikerriet
Sugar cane mosaic virus from maize
Suikerriet mozaiek virus uit mais
Sorghum red stripe virus from sorghum halepense
Sorghum red stripe virus uit sorghum halepense
Sorghum red stripe virus from maize
Sorghum red stripe virus uit mais
100 300 500 700 900 1100 1300 1500 1700 1900 2100
Length in mμ/Lengte in mμ

Fig. 2. Frequency diagrams of particle lengths.
Frequentie-diagrammen van de lengten der deeltjes.

Electron microscopical investigation

Materials and method

In making the preparations for electron microscopy the mosaic diseased *Sorghum halepense*, maize and sugar cane material used was the same as for the serological tests. The preparations were all made according to the "dipping method" of Brandes (1957). We examined the preparations with an electromagnetic electron microscope (Philips EM 100) at an electron optical magnification of 2,000. The measurements were made at a total magnification of 128,000 and the particle lengths divided into classes of 25 mμ.

Results

All preparations of the mosaic diseased leaf material contained flexible virus rods (Fig. 1). These particles were absent from healthy material. Frequency diagrams of the particle lengths show the following distribution (Fig. 2) with the mean lengths:

S.R.S.V. from *Sorghum halepense:* 700 mμ,
S.R.S.V. from maize: 775 mμ,
S.C.M.V. from sugar cane: 750 mμ,
S.C.M.V. from maize: 750 mμ.

Although maize plants inoculated with S.R.S.V. developed clear symptoms, it was nevertheless difficult to obtain preparations with a high concentration of virus particles. The number of particles measured was consequently less than in the case of *Sorghum* and sugar cane.

Discussion

From a comparison of the observed lengths of the two viruses obtained from various host plants it can be concluded that there is no demonstrable difference between the average lengths of S.C.M.V. and S.R.S.V.

In view of the fact that the electromagnetic electron microscope used in our experiments permits an experimental error of 10%, the absolute lengths obtained are less reliable than those obtained by Brandes (1959), using an electrostatic electron microscope. Since in our experiments we were only concerned with comparing the two viruses it is possible to say that the particles of S.C.M.V. and S.R.S.V. are identical with regard to their length.

Summary

Sorghum red stripe virus (S.R.S.V.) from Italy and sugar cane mosaic virus (S.C.M.V.) from Puerto Rico were investigated at Wageningen serologically and with the electron microscope.

By means of the microprecipitation test (van Slogteren, 1955) a qualitative relationship was established between the two viruses (Table 1). Electron microscopical investigations showed that with regard to their length there was no difference between the two viruses (Fig. 1 and 2).

Samenvatting

„*Sorghum* red stripe" virus (S.R.S.V.), afkomstig uit Italië, en suikerrietmozaïekvirus (S.C.M.V.) uit Portorico zijn te Wageningen serologisch en elektronenmicroscopisch onderzocht. Met behulp van de microprecipitatietoets (van Slogteren, 1955) kon een kwalitatieve verwantschap tussen de beide virussen aangetoond worden (tabel 1). Elektronenmicroscopisch onderzoek wees uit, dat er wat betreft de lengte der virusdeeltjes geen verschil bestaat tussen de twee genoemde virussen (fig. 1 en 2).

Acknowledgements

The authors are much indebted to Dr. J. E. Pérez of the Agricultural Experiment Station of Puerto Rico for sending the sugar cane sets and the S.C.M.V. antiserum.

Thanks are also due to Miss Dra. C. van der Scheer, Mr. S. Henstra and Mr. A. Mastenbroek of the Physico-Technical Service for Agriculture at Wageningen for making the electron micrographs, Dr. J. G. ten Houten of the Institute of Phytopathological Research for kindly giving us the opportunity to perform the measurements in his laboratory, Miss H. de Wit of the same Institute for helping with the projection and Mr. M. Martin of the University of Natal for his help with the translation.

References

Brandes, J., – 1957. Eine elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis faden und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen. Nachr.-Bl. Dtsch Pfl.-Sch.-D. (Braunschweig) 9: 151–152.

Brandes, J., – 1959. Elektronenmikroskopische Grössenbestimmung von acht stäbchen- und fadenförmigen Pflanzenviren. Phytopath. Z. 35: 205–210.

Goidanich, G., – 1938. Le malattie del sorgo zuccherino in Italia nelle ultime annate agrarie. Cellulosa 2: 245–250.

Goidanich, G., – 1939a. Le più importanti malattie del sorgo, con speciale riferimento a quelle del sorgo zuccherino. Indust. Saccar. Ital. 32: 77–101.

Goidanich, G., – 1939b. Ricerche sul deperimento del sorgo zuccherino verificatosi in Italia nella primavera del 1938. Boll. R. Staz. Patol. Veg., Roma 19: 1–74.

Gold, A. H. & G. P. Martin, – 1955. Electron microscopy of particles associated with sugar cane mosaic. Phytopath. (Abstr.) 45: 694.

Grancini, P., – 1955. Un mosaico del mais e del sorgo. Informatore Agrario 11: 718.

Grancini, P., – 1957. Un mosaico del mais e del sorgo in Italia. Maidica 2: 83–104.

Lovisolo, O., – 1957. Contributo sperimentale alla conoscenza ed alla determinazione del virus agente dell' arrossamento striato del sorgo e di un mosaico del mais. Boll. Staz. Pat. Veg., Roma 14 (1956): 261–321.

Pérez, J. E. & J. Adsuar, – 1954. Serological reactivity of sugar cane mosaic virus. J. Agr. Univ. Puerto Rico 38: 9–15.

Slogteren, D. H. M. van, – 1955. Serological micro-reactions with plant viruses under paraffin oil. Proc. Second Conf. Potato Virus Dis. Lisse-Wageningen, 1954: 51–54.

KORTE MEDEDELING

ELECTRON MICROSCOPICAL INVESTIGATIONS OF MOSAIC DISEASED WHEAT PLANTS FOUND IN ITALY[1]

Met een samenvatting: Elektronenmicroscopisch onderzoek van in Italië gevonden mozaïekzieke tarweplanten

BY

J. DIJKSTRA[2] and P. GRANCINI[3]

INTRODUCTION

For some years past a mosaic disease of wheat *(Triticum vulgare* L.) has been constatated at several places in the province of Brescia and must probably be attributed to a virus (GRANCINI, 1959). This year the same author has also found the disease in the province of Bergamo. In the field this disease occurs generally in larger or smaller patches.

In recently published papers a mosaic disease is mentioned again from Voghera (CORTE, 1960) and from the provinces Treviso and Bologna (CANOVA & QUAGLIA, 1960) but no decisive answer is given concerning its nature. Probably the disease is spread over the whole of North Italy. It can be assumed that in all the above mentioned cases we have to do with the same disease.

The present authors have investigated diseased wheat material with the aid of the electron microscope in order to ascertain whether virus is involved or not.

MATERIALS AND METHODS

For the first experiment leaves of mosaic diseased wheat plants were sent from Bergamo to Wageningen, where an attempt was made to obtain preparations by applying the "dipping method" (BRANDES, 1957).

Since the material was dried out, it was necessary to moisten it with a few drops of water before treating it according to the method mentioned above. In the second experiment all preparations were made at Bergamo, again using the "dipping method", and afterwards sent to Wageningen. We examined the preparations of both experiments with an electromagnetic electron microscope (Philips EM 100) at an electron optical magnification of 2,000. The measurements were made at a total magnification of 128,000 and the particle lengths divided into classes of 25 mμ.

RESULTS

In all preparations of diseased leaf material rod-shaped particles were found (Fig. 1). These particles were absent from healthy plants. The frequency diagrams of the lengths of the particles show that the main group of particles has a length of 300 mμ (Fig. 2).

[1] Accepted for publication 15 Sept., 1960.

[2] Laboratorium voor Virologie, Wageningen, The Netherlands.
[3] Stazione Sperimentale di Maiscoltura, Bergamo, Italy.

In experiment 1, where 51 % of the counted particles had a length of 300 mμ, the scatter over the whole length scale was greater than in experiment 2 where 62 % belong to the 300 mμ category.

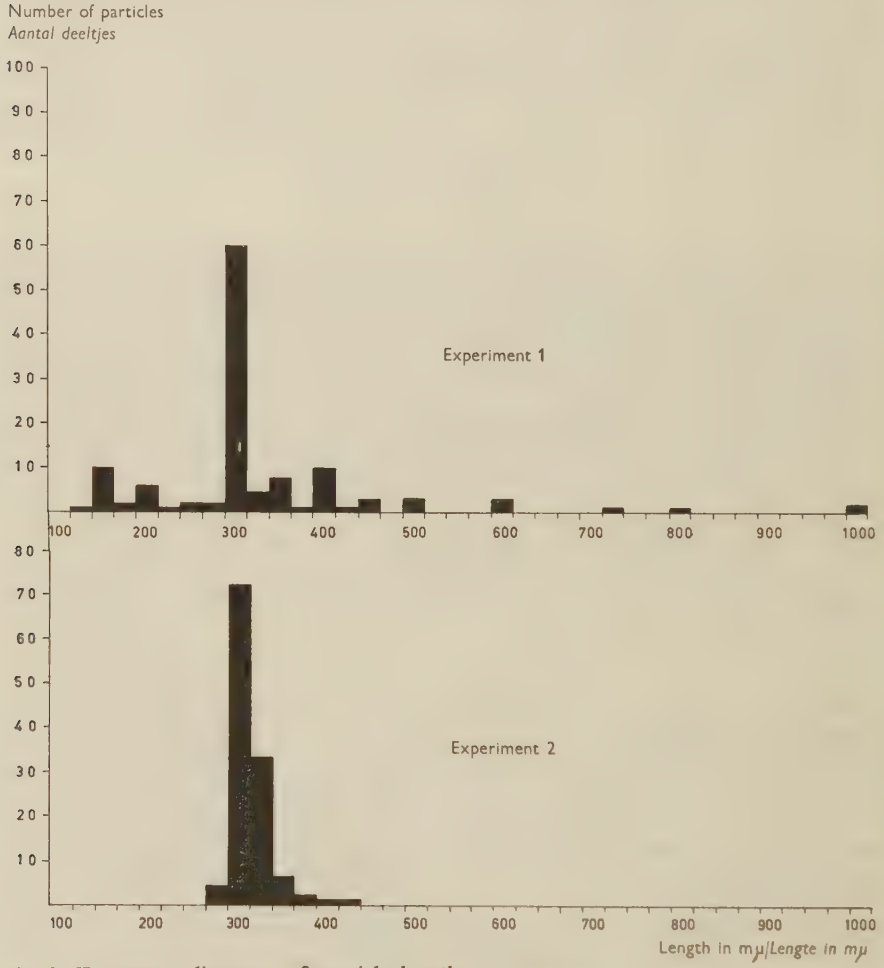

Fig. 2. Frequency diagrams of particle lengths.
Frequentie-diagrammen van de lengten der deeltjes.

Discussion

It is evident from the electron microscopical investigations that there is a virus in the diseased wheat plants. A relation between this virus and the well-known cereal viruses, as described in the survey by Klinkowsky & Kreutzberg (1958), could not be established since particle sizes have not yet been determined for all these cereal viruses.

The cereal viruses with known dimensions have lengths which differ from that observed in our experiments with the unidentified mosaic disease of wheat. In the literature the length of Barley stripe mosaic virus is given as 150–180 mμ

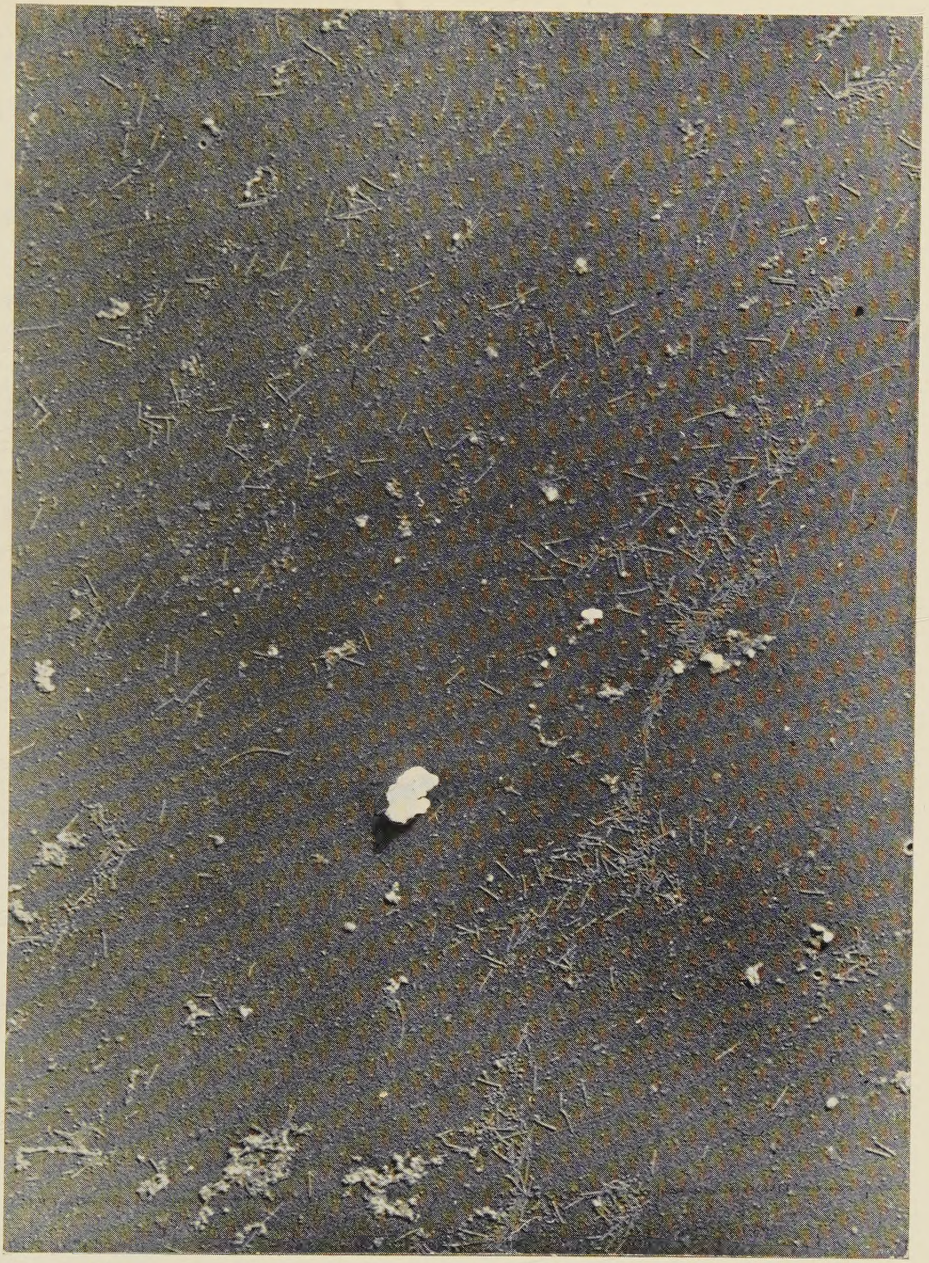

FIG. 1. Virus particles in preparations from diseased wheat plants.
Magnification: × 10,000; palladium-shadowed.
Photograph Physico-Technical Service for Agriculture, Wageningen.
Virusdeeltjes in preparaten afkomstig van zieke tarweplanten.
Vergroting 10.000 ×; *geschaduwd met palladium.*
Foto Stichting Landbouw Fysisch-Technische Dienst, Wageningen.

(SHALLA, 1959) and 126 mμ (BRANDES, 1959), of Barley false-stripe virus 130 mμ (GOLD, SUNESON, HOUSTON & OSWALD, 1954), of wheat streak mosaic virus 670 mμ (GOLD, HOUSTON & OSWALD, 1953), 650 mμ (BRAKKE & STAPLES, 1958) and 702 mμ (BRANDES, 1959) and of oat red leaf virus 150 mμ (THORNBERRY, VATTER & HICKMAN, 1953).

For the wheat mosaic virus found in the U.S.A., SMITH (1957) reports a length of 400-700 mμ, in contrast to THORNBERRY et al. (1957) who found a length of 280 mμ for a virus from mosaic diseased wheat plants.

Consequently it might be possible that there exists a resemblance between this wheat mosaic virus from the U.S.A. and the unidentified wheat virus from Italy. However, THORNBERRY et al. also detected in the same object particles that appeared to be spherical with a diameter of 40 mμ.

It must be taken into account that these authors obtained their preparations by purification by means of ultra centrifugation, whereas ours were prepared according to the "dipping method".

Up to the present we have not succeeded in infecting healthy wheat plants by mechanical inoculation with carborundum powder and we have not yet been able to decide whether the virus is soil-transmissible or not.

SUMMARY

For some years past at several places in the province of Brescia a mosaic disease of wheat has been detected which probably must be attributed to a virus (GRANCINI, 1959). Presumably the same disease has recently been constatated in other provinces of North Italy.

Electron microscopical study of diseased wheat leaves showed that the preparations which were obtained with the "dipping method" of BRANDES (1957) all contained rod-shaped virus particles with a length of 300 mμ. These particles were absent from healthy plants. Whether or not this virus is directly responsible for the mosaic disease could not be established, since we did not succeed in transmitting the virus artificially.

SAMENVATTING

Sedert enige jaren wordt op verschillende plaatsen in de provincie Brescia een mozaïekziekte bij de tarwe gevonden, waarvan de oorzaak waarschijnlijk aan een virus moet worden toegeschreven (GRANCINI, 1959).

Bij elektronenmicroscopisch onderzoek van zieke bladeren is gevonden, dat de preparaten, welke met de „doop-methode"van BRANDES (1957) verkregen waren, alle staafvormige virusdeeltjes ter lengte van 300 mμ bevatten (fig. 1). In preparaten van gezond bladmateriaal kwamen deze deeltjes niet voor. Of dit virus direct aansprakelijk is voor de mozaïekziekte kon nog niet aangetoond worden, aangezien het tot nu toe niet gelukt is het virus langs kunstmatige weg over te brengen.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their sincere appreciation to Miss Dra. C. VAN DER SCHEER and Mr. A. MASTENBROEK of the Physico-Technical Service for

Agriculture at Wageningen for making the electron micrographs and to Mr. M. M. MARTIN of the University of Natal for correcting the English text.

REFERENCES

BRAKKE, M. K. and R. STAPLES, – 1958. Correlation of rod length with infectivity of wheat streak mosaic virus. Virology 6: 14–26.

BRANDES, J., – 1957. Eine elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis faden- und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen. Nachr.-Bl. Dtsch. Pfl.-Sch.-D. (Braunschweig) 9: 151–152.

BRANDES, J., – 1959. Elektronenmikroskopische Grössenbestimmung von acht stäbchen- und fadenförmigen Pflanzenviren. Phytopath. Z. 35: 205–210.

CANOVA, A. & A. QUAGLIA, – 1960. Il mosaico del frumento. Informatore Fitopatologico 10: 206–208.

CORTE, A., – 1960. Notizie preliminari su una manifestazione del tipo „mosaico" riscontrata sul Frumento in provincia di Pavia. Atti Ist. Bot. Lab. Critt. Univ. Pavia 18: 124–129.

GOLD, A. H., B. R. HOUSTON & J. W. OSWALD, – 1953. Electron microscopy of elongated particles associated with wheat streak mosaic. Phytopathology 43: 458–459.

GOLD, A. H., C. A. SUNESON, B. R. HOUSTON & J. W. OSWALD, – 1954. Electron microscopy and seed and pollen transmission of rod-shaped particles associated with the false stripe virus disease of barley. Phytopathology 44: 115–117.

GRANCINI, P., – 1959. Una malattia del Frumento che è probabilmente una virosi. Italia Agricola 8: 667–670.

KLINKOWSKI, M. & G. KREUTZBERG, – 1958. Vorkommen und Verbreitung von Gramineenvirosen in Europa. Phytopath. Z. 32: 1–24.

SHALLA, T. A., – 1959. Relations of tobacco mosaic virus and barley stripe mosaic virus to their host cells as revealed by ultrathin tissue sectioning for the electron microscope. Virology 7: 193–219.

SMITH, K. M., – 1957. A textbook of plant virus diseases: 602–605.

THORNBERRY, H. H., A. E. VATTER & D. HICKMAN, – 1953. Virus like particles from some plants having symptoms of virus disease. Phytopathology 43: 486.